UNTERSUCHUNGEN ZUR TAGESRHYTHMIK DES ENERGIESTOFFWECHSELS DER RATTENLEBER IN VIVO UND IN VITRO

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dietmar Laspe
aus Göttingen

Göttingen 1976

UNTERSUCHUNGEN ZUR TAGESRHYTHMIK DES ENERGIESTOFFWECHSELS DER RATTENLEBER IN VIVO UND IN VITRO

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

UNIV. LIBRARY

vorgelegt von

Dietmar Laspe

aus Göttingen

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7
Referent: Prof. Dr. L. Rensing
Korreferent: Prof. Dr. G. Birukow
Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1976

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG 1

A. MATERIAL UND METHODEN

1. Allgemeines 4

2. Fraktionierung der Leber in die Zellkomponenten und Isolierung von Zellkernen, Mitochondrien und löslicher Plasmafraktion

a. Leberpräparation und Desintegration 5

b. Isolierung der Kernfraktion 5

c. Reinigung der Kernfraktion 6

d. Isolierung der Mitochondrien 6

e. Isolierung der löslichen Fraktion 7

3. Haltung von isolierten Mitochondrien in Suspensionskultur

a. Zusammensetzung des Kulturmediums 7

b. Ansetzen des Mediums 7

c. Herstellung der Mitochondriensuspension 8

4. Extraktion von ATP aus den verschiedenen Zellfraktionen

a. Mitochondrien und Zellkerne 8

b. Cytoplasma - Fraktion 9

c. Mitochondrien aus der Suspensionskultur 9

5. Quantitative ATP - Bestimmung 9

6. Bestimmung der Aktivität der Isocitrat - Dehydrogenase aus Mitochondrien

a. Allgemeines 11

b. Bestimmung der Aktivität der NAD - abhängigen ICDH (EC 1.1.1.41) 12

c. Aktivitätsbestimmung der NADP - abhängigen
ICDH (EC 1.1.1.42) 12
7. Spektrophotometrische Bestimmung des Gesamtprotein-
gehaltes 13
B. ERGEBNISSE
1. ATP - Gehalt verschiedener Zellfraktionen in vivo
im Verlauf des Tages
a. Mitochondrien 15
b. Zellkerne 16
c. Cytoplasma 17
2. In vitro Untersuchungen zum ATP - Gehalt von
Mitochondrien im Verlauf des Tages 19
a. ATP - Synthese nach Zugabe von ADP zur
Suspensionskultur 19
b. Hemmung der ATP - Synthese nach Antimycin A -
Behandlung 21
c. Hemmung der oxidativen Phosphorylierung
durch Valinomycin 22
d. Verlauf des ATP - Gehaltes von in vitro gehaltenen
Mitochondrien über 24 Std 24
e. Kapazität der ATP - Synthese von Mitochondrien
unter in vitro Bedingungen über 24 Std 26
3. In vitro Untersuchungen zum Aktivitätsverlauf der
Isocitrat - Dehydrogenase in Mitochondrien über 36 Std 26
a. NAD - spezifische Isocitrat - Dehydrogenase
a.1. Hell - Dunkel - Wechsel 12 : 12 Std von
6.00 - 18.00 Uhr 27
a.2. Dauerdunkel 30
a.3. Dauerlicht 31

b. NADP - spezifische Isocitrat - Dehydrogenase

b.1. Hell - Dunkel - Wechsel 12 : 12 Std

von 6.00 - 18.00 Uhr 32

b.2. Dauerdunkel 34

C. DISKUSSION 36

D. ZUSAMMENFASSUNG 48

E. LITERATUR 50

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534923_0021

EINLEITUNG

Es ist bekannt, daß sehr viele physiologische Prozesse im pflanzlichen, tierischen und menschlichen Organismus tagesrhythmisch verlaufen (ASCHOFF, 1965; BÜNNING, 1964; MILLS, 1966). Diesen Rhythmus kann man bis hinunter zu Einzellern verfolgen, so z.B. beim Einbau von Nucleinsäurevorstufen in Paramecium (EHRET und MATHER, 1959), bei der Biolumineszenz von Gonyaulax (HASTINGS und SWEENEY, 1958), bei der Photosynthese von Acetabularia (SWEENEY und HAXO, 1961), aber auch bei isolierten Gewebezellen (STRUMWASSER, 1965) und Zellkulturen von Organen höherer Organismen, wie bei der Respiration von Nebennierenzellen des Hamsters (ANDREWS und FOLK, 1964) und der Enzymaktivität der Tyrosin - Aminotransferase von Leberparenchymzellen neugeborener Ratten (HARDELAND, 1972). Alle diese Befunde lassen darauf schließen, daß primäre Rhythmen auf der zellulären Ebene zu suchen sind. Es ist aber noch unklar, welche Mechanismen am Zustandekommen eines intrazellulären "Grundrhythmus" (RENSING, 1967) beteiligt sind. Er ist wahrscheinlich endogen und angeboren, wird jedoch von tagesperiodischen Änderungen der Umweltbedingungen synchronisiert (ASCHOFF, 1960).

In den letzten Jahren sind große Anstrengungen unternommen worden, um die Natur dieses Grundrhythmus aufzuklären; dabei beschäftigte sich eine große Zahl von Arbeiten mit der Mitose, den Syntheseleistungen und Enzymaktivitäten der Zelle (Zusammenfassung, HARDELAND et al., 1973). Es ergab sich zwangsläufig die Frage, wo in der Zelle der primäre Oszillator zu lokalisieren ist. Als Antwort auf diese Frage werden in letzter Zeit drei Hypothesen diskutiert. Die erste Hypo-

these, die die ganze Zelle als primären Oszillator postuliert, wird widerlegt sowohl durch die Befunde von SWEENEY und HAXO (1961) an kernlosen Zellen von Acetabularia als auch durch die in menschlichen Erythrozyten nachgewiesenen circadianen Rhythmen (ASHKENAZI und HARTMANN, 1975). Die zweite Hypothese geht von der Annahme aus, daß der Oszillator in einem oder mehreren der verschiedenen Kompartimente der Zelle zu suchen ist. Dagegen sprechen in vivo - und in vitro - Untersuchungen an verschiedenen Zellorganellen. Eine dritte Hypothese geht vom Zusammenwirken verschiedener Zellkompartimente bzw. Membranen und Zytoplasma aus. Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse und hier speziell der in menschlichen Erythrozyten nachgewiesenen circadianen Rhythmen erscheint sie am meisten fundiert und plausibel.

In diesem Zusammenhang existieren mehrere Modelle, die den molekularen Mechanismus des Oszillators zu erklären versuchen. Das Chronon - Modell, das von EHRET und TRUCCO (1967) entwickelt wurde, arbeitet mit der Vorstellung, daß der Rückkopplungsmechanismus zwischen nuclearer RNA - Synthese im Zellkern und bestimmten Proteinen im Cytoplasma den primären Oszillator darstellt. Ein weiteres Modell, das Membranmodell (NJUS et al., 1974), geht von oszillatorischen Änderungen der Membranpermeabilität aus, die durch einen Rückkopplungsmechanismus reguliert werden.

FROSCH und WAGNER (1973), CUMMING und WAGNER (1968) nehmen an, daß die circadiane rhythmische Kontrolle der verschiedensten Prozesse auf einem circadianen Rhythmus im Energiestoffwechsel basiert. Für alle Modelle gibt es Befunde, die für bzw. gegen die hypothetischen Voraussetzungen sprechen.

Meine eigenen Untersuchungen zum Energiestoffwechsel in der Rattenleber wurden mit der Intention begonnen, Argumente für oder gegen das Energiestoffwechsel - Modell von WAGNER zu finden. Bisherige Ergebnisse

in bezug auf das Energiestoffwechsel - Modell wurde an Pflanzenmaterial (Chenopodium rubrum; FROSCH und WAGNER, 1973) gewonnen.
Es erschien mir aus diesem Grund interessant, näheres über die Tagesperiodizität des ATP - Stoffwechsels in der Rattenleber in Erfahrung zu bringen.
Ich bestimmte zunächst die ATP - Konzentration in Mitochondrien, Zellkernen und Cytoplasma der Rattenleber in vivo zu verschiedenen Tageszeiten, um Aufschluß über die Verteilung des energiereichen Phosphats in den wichtigsten Zellkomponenten im Verlauf des Tages zu bekommen.
Darüberhinaus bestimmte ich den ATP - Gehalt von Mitochondrien in vitro.
Zu diesem Zweck entwickelte ich eine Methode zur Haltung von Mitochondrien in Suspensionskultur über einen längeren Zeitraum; dabei wurde der Erhaltungszustand anhand der Fähigkeit zur ATP - Synthese aus ADP sowie der Kopplung der oxidativen Phosphorylierung überprüft. Weiterhin wurden im Rahmen der in vitro Untersuchungen Enzyme des Citrat - Zyklus auf tagesrhythmische Änderungen in ihrer Aktivität getestet.
Dies geschah am Beispiel der NAD - bzw. NADP - spezifischen Isocitrat - Dehydrogenasen sowohl bei Hell - Dunkel - Wechsel von 12 : 12 Stunden von 6.00 - 18.00 Uhr, als auch bei Dauerlicht und Dauerdunkel.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Rensing für Anregungen und Diskussion der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Problematik, für die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und für sein großes Interesse am Fortschritt der Untersuchungen.

A. MATERIAL UND METHODEN

1. Allgemeines

Für meine Versuche verwendete ich ausschließlich männliche Sprague-Dawley Ratten aus einem hauseigenen Inzuchtstamm. Die Tiere waren ca. 5 Monate alt und wogen in der Regel 450 - 500 g. Sie wurden in Metallgitterkäfigen von 60 x 60 x 30 cm in Gruppen zu 10 - 14 Ratten gehalten. Der Zuchtraum hatte eine konstante Temperatur von 22° C und einen Licht - Dunkel - Wechsel von 12 : 12 Stunden (Licht von 6.00 - 18.00 Uhr MEZ, Dunkel von 18.00 - 6.00 Uhr MEZ). Die Fütterung erfolgte täglich zwischen 17.00 und 18.00 Uhr mit ALTROMIN® Fertigfutter, die Wasserversorgung durch automatische Tränken. Wasser und Futter waren immer ad libitum vorhanden.

Die Chemikalien, die ich für meine Untersuchungen benötigte, waren p.A. bzw. für biochemische Zwecke. Sie stammten von den Firmen MERCK, RIEDEL DE HAEN, SERVA, BOEHRINGER und CALBIOCHEM. Das zum Ansetzen des Luciferin - Luciferase - Testgemisches verwendete Natriumhydrogenarsenat (RIEDEL DE HAEN) war als einzige Ausnahme chemisch rein. Rinderserumalbumin (SERVA), welches ich zur Komplettierung des Mitochondrien - Kulturmediums benötigte, war nur lyophilisiert, rein zu erhalten und mußte vor seiner Verwendung weiter gereinigt werden. Zu diesem Zweck dialysierte ich das Albumin gegen aqua dest., fällte es anschließend mit Äthanol aus und erhielt nach Trocknung des Niederschlages mit Aceton ein reinweißes Pulver.

Alle photometrischen Bestimmungen erfolgten im Spektralphotometer PM Q II der Firma ZEISS mit Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke. Die quantitative Bestimmung der Lichtemission bei der ATP - Messung führte ich in einem TRICARB Mod. 3320 Flüssigkeits - Szintillations-

zähler der Fa. PACKARD durch.

Die für die Aufarbeitung des Lebermaterials notwendigen Arbeitsschritte wurden in der Kühlkammer bei 3^{o} C durchgeführt. Homogenisiert wurde in einem Potter Elvehjem - Homogenisator der Fa. BRAUN Melsungen mit 30 ml Fassungsvermögen. Für die Zentrifugationen benutzte ich Tischzentrifugen (JUNIOR I + III) und die Kühlzentrifuge - Modell Omikron - der Fa. CHRIST ebenfalls bei 3^{o} C.

2. Fraktionierung der Leber in die Zellkomponenten und Isolierung von Zellkernen, Mitochondrien und löslicher Plasmafraktion

a. Leberpräparation und Desintegration

Jeweils im Abstand von 4 Stunden wurden vier Tiere durch Genickschlag getötet und sofort ca. 5 - 10 g Leber herauspräpariert. Eventuell anhaftendes Blut wurde zwischen Filtrierpapier entfernt. In den Gefäßen befindliches Blut wurde durch leichten Druck herausgepreßt und vom Filtrierpapier aufgesogen. Anschließend überführte ich die Leberstückchen in eine eiskalte Lösung aus 0,25 M Saccharose, 0,05 M tris - HCl, pH 7,5 bei 20^{o} C; 0,025 M KCl und 0,005 M $MgCl_2$ (TKM - Saccharose). Die Desintegration der Leberzellen erfolgte in 5 Volumen TKM - Saccharose mit einem Glashomogenisatorgefäß und Teflonpistill nach der Methode von POTTER und ELVEHJEM (1936), wobei acht Durchgänge mit dem Pistill ausreichten. Vor der Weiterverarbeitung wurde das Homogenat durch Perlongaze filtriert, um Bindegewebe, größere Teile der Tunica fibrosa und der Lebervenen und -arterien zurückzuhalten.

b. Isolierung der Kernfraktion

Die Isolierung der Kern- und Mitochondrienfraktion beruhte auf der Methode von SCHNEIDER und HOGEBOOM (1950), wobei die Saccharose - Lösung von mir durch TKM - Saccharose pH 7,5 ersetzt wurde.

Die Homogenate wurden in 50 ml - Zentrifugenbecher pipettiert und für 15 min bei 700 g und 3° C zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren der Überstände wurden die Sedimente zweimal gewaschen, indem sie mit 10 ml eiskalter TKM - Saccharose vorsichtig homogenisiert und anschließend wie zuvor zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden gesammelt und für die Isolierung der Mitochondrien in Eis aufbewahrt. Das Pellet enthielt alle im Lebergewebe vorhandenen Zellkerne, sie waren jedoch kontaminiert mit intakten Leberzellen, Erythrozyten, Endoplasmatischem Reticulum und ca. 10% der im Gewebe vorhandenen Mitochondrien.

c. Reinigung der Kernfraktion

Zur Isolierung der Zellkerne aus der Kernfraktion benutzte ich eine Methode nach BLOBEL und POTTER (1966), die auf der von CHAUVEAU et al. (1956) beruht. Die hierbei verwendeten Saccharoselösungen stellte ich aus handelsüblichem Raffinade - Zucker der Firma "Union - Zucker" GmbH, Northeim her. Zur Reinigung wurde eine ca. 2,2 M Zuckerlösung mit Aktivkohle gekocht und zweimal filtriert (STEELE und BUSCH, 1967).

Das im Abschnitt 2b beschriebene Pellet suspendierte ich unter Zugabe von 2,3 M TKM - Saccharose pH 7,5 im Homogenisator, sodaß die Konzentration des Homogenats einen Wert von 1,62 M erreichte. Diese Mischung überführte ich in Zentrifugenbecher, unterschichtete mit ca. 15 ml 2,3 M TKM - Saccharose und zentrifugierte für 75 min bei 40 000 g und 2° C. Der Überstand wurde verworfen, das Kernpellet mit 15 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zur Extraktion von ATP in 5 ml 0,01 M Glycinpuffer pH 11,0 aufgenommen. Die Zellkerne lagen jetzt mikroskopisch rein vor.

d. Isolierung der Mitochondrien

Die vereinigten Überstände der Kernfraktion zentrifugierte ich bei

3° C und 5000 g für 15 min. Die Sedimente resuspendierte ich in 10 ml 0,25 M TKM - Saccharose und zentrifugierte wie oben. Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Die Überstände verwarf ich, sie enthielten die Mikrosomenfraktion und aufgebrochene Mitochondrien, die als weiße Schicht an der Oberfläche des Überstandes schwammen. Das Pellet, in dem die Mitochondrien rein vorlagen, wurde ebenfalls in Glycinpuffer suspendiert.

e. Isolierung der löslichen Fraktion

Zur Isolierung der löslichen Cytoplasma - Fraktion entnahm ich der Ratte, wie oben beschrieben, ein Leberstückchen von ca. 0,5 g aus dem linken vorderen Leberlappen und führte eine Gewichtsbestimmung mit der Analysenwaage durch. Nach dem Homogenisieren in eiskaltem 0,01 M Glycinpuffer pH 11,0 überführte ich das Homogenat in 12 ml - Zentrifugenbecher und zentrifugierte für 60 min bei 120 000 g und 0° C. Der Überstand enthielt nach der Zentrifugation alle löslichen Bestandteile des Cytoplasma und wurde zur Weiterverarbeitung abpipettiert.

3. Haltung von isolierten Mitochondrien in Suspensionskultur

a. Zusammensetzung des Kulturmediums.

Das Inkubationsmedium wurde nach der Methode von SUCHY und COOPER (1974) zusammengestellt und von mir mit verschiedenen Ionen komplettiert.

Zusammensetzung: 80 mM KCl, 50 mM Morpholinopropansulfonsäure, 1 mM Äthylenglykolltetraacetat, 1 mg / ml dialysiertes Rinderserumalbumin, 10 mM $CaCl_2$, 12,5 mM $MgCl_2$, 2 mM KH_2PO_4, 0,1 mg Penicillin pro ml, 0,1 mg Streptomycin pro ml, 1 mM Adenosindiphosphat.

b. Ansetzen des Mediums

Die oben angegebenen Substanzen wurden mit Ausnahme der Antibiotica

und Adenosindiphosphat in aqua bidest. gelöst. Unmittelbar vor dem Sterilfiltrieren wurden die restlichen Substanzen hinzugefügt und der pH - Wert auf 7,0 mit KOH : NaOH (1:1) eingestellt. Die Sterilfiltration erfolgte in einem SEITZ - Filter. Die Filterschicht wurde mit aqua dest. vorbehandelt, um lösliche Stoffe daraus zu entfernen.

c. Herstellung der Mitochondriensuspension

Die wie in Abschnitt 2d beschrieben hergestellte Mitochondrienfraktion wurde einmal mit Kulturmedium gewaschen. Fraktionen von drei Ratten wurden dann mit 250 ml Medium in verschließbare Kulturflaschen (Vol. 1000 ml) überführt. Die Gasphase in den Kulturflaschen bestand aus Carbogen (95% O_2; 5% CO_2) und wurde täglich bzw. nach jeder Probenentnahme erneuert. Die so vorbereiteten Kulturen wurden in einem speziell vorbereiteten Thermoschrank bei 37^{o} C und einem Hell - Dunkel - Wechsel von 12 : 12 Stunden von 6.00 - 18.00 Uhr aufbewahrt. Mit Hilfe von teflonbeschichteten Magnetstäben in den Mitochondriensuspensionen wurden diese mit ca. 60 U/min gerührt.

4. Extraktion von ATP aus den verschiedenen Zellfraktionen

a. Mitochondrien und Zellkerne

Die isolierten und gereinigten Mitochondrien und Zellkerne wurden in 5 ml 0,01 M Glycinpuffer pH 11,0 und einer Temperatur von ca. 80^{o} C suspendiert, in ein Wasserbad von 95^{o} C überführt und für 10 min auf dieser Temperatur gehalten. Kern- bzw. Mitochondrienmembranen brachen bei dieser Behandlung auf, ATP - abbauende Enzyme wurden inaktiviert und denaturiert, während sich das freigesetzte ATP nicht veränderte (KALBHEN und KOCH, 1967). Zur Überprüfung dieser Tatsache erhitzte ich Proben bekannten ATP - Gehaltes nach oben beschriebener Methode und

fand eine Erniedrigung der Konzentration von maximal 0,2%.
Nach der Extraktion wurden die Proben sofort im Eisbad abgekühlt und anschließend bis zur ATP - Bestimmung eingefroren. Vor der Messung zentrifugierte ich bei 3000 g die festen Bestandteile aus den Proben ab und benutzte den klaren Überstand zur ATP - Bestimmung.

b. Cytoplasma - Fraktion

Da die lösliche Fraktion bereits in Glycinpuffer extrahiert wurde, mußte zur Stabilisierung von ATP lediglich eine Denaturierung der entsprechenden Enzyme durchgeführt werden, und zwar ebenfalls im Wasserbad nach oben beschriebener Methode. Um zur ATP - Bestimmung einen klaren Überstand zu erhalten, zentrifugierte ich denaturiertes Protein.

c. Mitochondrien aus der Suspensionskultur

Aus der Mitochondrienkultur wurden mit einer sterilen Pipette Proben entnommen, in Zentrifugengläser überführt und die Mitochondrien bei 700 g für 10 min abzentrifugiert. Das Mitochondrien - Pellet suspendierte ich in 0,01 M Glycinpuffer und verfuhr dann wie unter 4a beschrieben.

5. Quantitative ATP - Bestimmung

Für die Bestimmung der ATP - Konzentration in den verschiedenen Extrakten verwendete ich ein Verfahren, das auf von STREHLER und TOTTER (1952), STREHLER und MC ELROY (1957) und LEE et al. (1970) beschriebenen Methoden beruht. Sie arbeiteten mit Extrakten aus dem Leuchtorgan des Glühwürmchens, Photinus pyralis. Das in diesen Extrakten vorhandene Luciferin - Luciferase - System erzeugt bei Zugabe von ATP eine spezifische Biolumineszenzreaktion. Für die

Lichtemission sind außerdem zwei weitere Komponenten notwendig: Sauerstoff und ein zweiwertiges Kation, z.B. Mg^{2+}. Das Luciferin - Luciferase - Gemisch bezog ich von der Firma SERVA. Luciferin - Luciferase wurde in 0,1 M Natriumhydrogenarsenat 0,02 M Magnesiumsulfat (pH 7,4) gelöst und für jede Bestimmung frisch angesetzt (das oft zu diesem Zweck verwandte Glycin besitzt bei pH 7,4 nur geringe Pufferkapazität, zum anderen erhöht Arsenat die Stabilität der Luminiszenzreaktion). Die Lösung wurde mit Sauerstoff angereichert und sofort zur Messung eingesetzt. Die von KALBHEN und KOCH (1967) gefundene starke Abnahme der Enzymaktivität während der ersten Stunden konnte ich nicht feststellen.

Jeweils 0,5 ml der ATP - haltigen Proben wurden in Kunststoffszintillationsröhrchen pipettiert und für mehrere Stunden dunkel gestellt, um den Background bei der Messung möglichst gering zu halten. Die ATP - Bestimmung erfolgte in einem TRICARB Mod. 3320 Flüssigkeits - Szintillationszähler der Fa. PACKARD bei folgender Einstellung: 40% Verstärkung, Fenster 50 - ∞ und ausgeschalteter Koinzidenz. Ca. 15 Sekunden nach Zugabe von 4,5 ml Enzymlösung zu den Proben wurde die Lichtemission für 2 Sekunden gemessen. Bei jedem Bestimmungsansatz wurden Proben bekannter ATP - Konzentration (10^{-8} bis 10^{-5} M ATP gelöst in 0,01 M Glycin, pH 11,0) in gleicher Weise mitbestimmt. Daraus ergab sich jeweils eine Eichkurve, wie sie in Fig. 1 dargestellt ist. Bei den einzelnen Bestimmungsreihen achtete ich streng darauf, daß die Meßwerte in den linearen Teil der Eichkurve fielen. Darüberhinaus hielt ich die Kationenkonzentration und die Konzentration bestimmter Anionen wie Chlorid konstant und möglichst niedrig, da sie die Lichtemission beeinflussen, wie ALEDORT et al. (1966) und DENBURG und MC ELROY (1970) berichten.

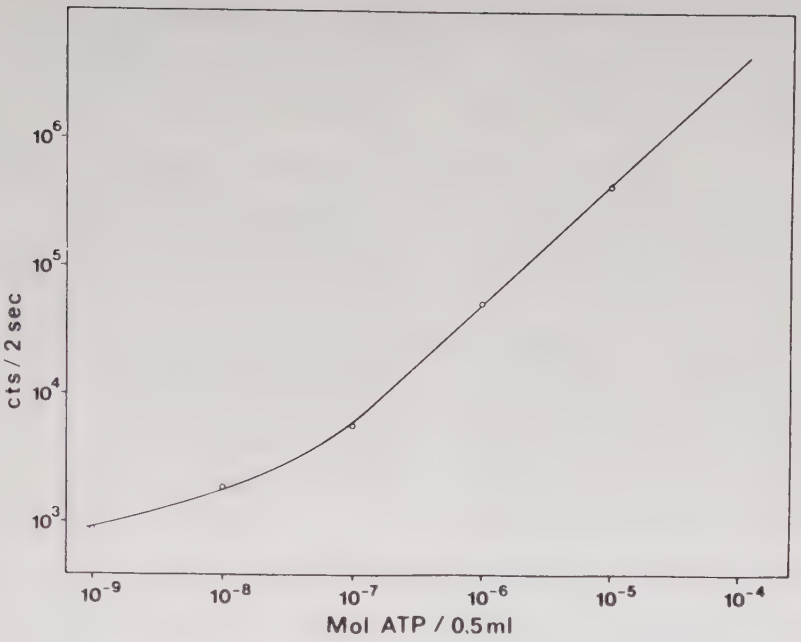

Fig. 1 Zusammenhang zwischen ATP - Konzentration und Lichtemission.

6. Bestimmung der Aktivität der Isocitrat - Dehydrogenase aus Mitochondrien

a. Allgemeines

Aus den Mitochondrienkulturen wurden Proben von 30 ml entnommen, die Mitochondrien bei 700 g abzentrifugiert, das Pellet in 0,9% NaCl aufgenommen und bis zur Aktivitätsbestimmung der Isocitrat - Dehydrogenase (ICDH) bei -18^{o} C aufbewahrt. Um das Enzym aus den Mitochondrien freizusetzen, benutzte ich eine YEDA - Press. Nach dreimaligem Durchpressen unter 60 atü war die Enzymausbeute optimal. Anschließend zentrifugierte ich die Mitochondrienbruchstücke bei 5000 g für 30 min ab.

Die für die Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendeten Methoden sind Modifikationen der von BERNT und BERGMEYER (1974) für die NADP - abhängige ICDH und COLMAN (1975) für die NAD - abhängige ICDH angewandten.

b. Bestimmung der Aktivität der NAD - abhängigen ICDH (EC 1.1.1.41)
Die Aktivität wurde bestimmt aus der Geschwindigkeit der durch die Reaktion

$$\text{Isocitrat} + NAD^+ \xrightleftharpoons{ICDH} \alpha\text{- Ketoglurat} + CO_2 + NADH + H^+$$

hervorgerufenen Zunahme der NADH - Konzentration. NADH hat im optischen Test ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und wird deshalb als Meßgröße herangezogen. Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt bei 340 nm 6,22 cm^2 / µMol.
Zusammensetzung des Bestimmungsansatzes: 2,5 ml Triäthanolamin - hydrochlorid - Puffer, 0,1 M, pH 7,5, darin gelöst 4,6 mM DL - Isocitrat und 52 mM Natriumchlorid; 0,1 ml Mangansulfat, 0,12 M, darin gelöst 10 mM NAD und 1 mM ADP; 1 ml Mitochondrienextrakt.
Puffer / Substrat - Lösung und Mitochondrienextrakt wurden bei 25° C ca. 5 min präinkubiert, dann in eine Küvette gegeben, NAD / Mn^{2+} / ADP - Lösung hinzupipettiert, mit einem Plastikspatel gut durchgemischt und anschließend die Extinktion in Abständen von 30 Sekunden über 2 Minuten abgelesen.

c. Aktivitätsbestimmung der NADP - abhängigen ICDH (EC 1.1.1.42)
Die Aktivität wurde bestimmt aus der Geschwindigkeit der Reduktion von $NADP^+$. Die Reaktion verläuft wie unter 6b beschrieben, einziger Unterschied: Als Coenzym $NADP^+$ statt NAD^+. $NADPH^+$ hat ebenso wie NADH ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und einen Extinktionskoeffizienten von 6,22 cm^2 / µMol.
Testansatz: Der Ansatz unterscheidet sich in zwei Punkten von dem

unter 6b beschriebenen: 1. 10 mM NADP statt NAD, 2. der Zusatz von 1 mM ADP entfällt.

7. Spektrophotometrische Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Um den Proteingehalt der untersuchten Fraktionen zu messen, modifizierte ich die Methode von LOWRY et al. (1951). In Reagens B wurde Natriumartrat durch 1%iges Natriumcitrat ersetzt, da die Stabilität der Lösung erhöht wurde. Diese Modifikation hatte keine Auswirkungen auf die Ergebnisse und wurde nur aus meßtechnischen Gründen angewandt.

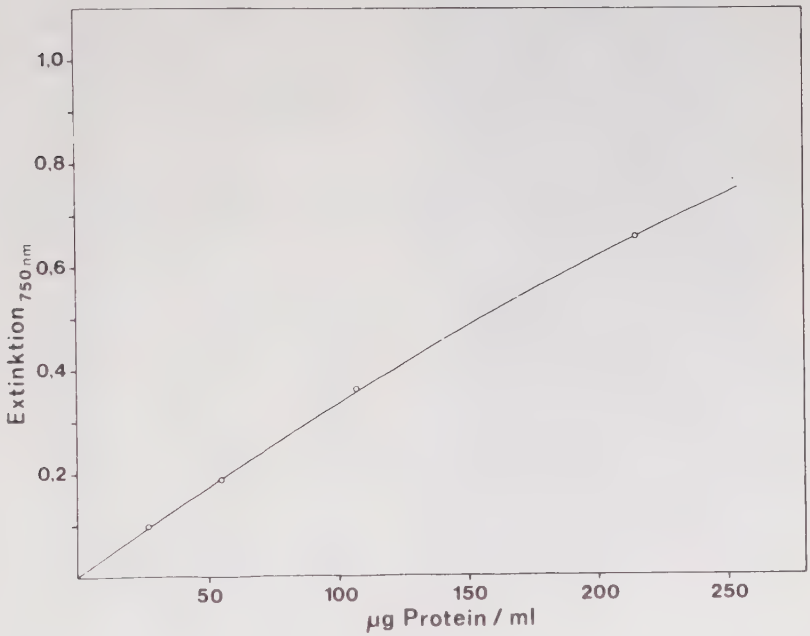

Fig. 2 Eichkurve zur Bestimmung des Proteingehaltes; aufgestellt mit in 1N NaOH gelöstem Rinderserumalbumin und gemessen gegen 1N NaOH bei Zimmertemperatur.

Das Folin - Ciocalteau - Phenolreagens (Fa. MERCK) wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 1 mit Aqua dest. verdünnt. Von dieser Lösung gab ich 1 ml statt 0,5 ml zum Probenansatz. Die Proben wurden in Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 750 nm photometriert. Gemessen wurde gegen einen Standard, der aus 1 ml 1 N NaOH, 5 ml Reagens D und 1 ml Reagens E hergestellt wurde. Zur Umrechnung der gefundenen Extinktionswerte auf Proteinkonzentrationen benutzte ich eine Eichkurve, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (Fa. SERVA) gelöst in 1 N NaOH hergestellt wurde. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden ebenfalls mit NaOH auf eine Normalität von 1 N eingestellt, da sich unterschiedliche Meßwerte ergaben, wenn die NaOH - Konzentration verändert wurde. Unlösliches Protein wurde im Wasserbad bei 70° C über 30 Minuten erhitzt und gelöst.

Die Proteinkonzentrationen ergaben sich aus der in Fig. 2 dargestellten Eichkurve.

B. ERGEBNISSE

1. ATP - Gehalt verschiedener Zellfraktionen in vivo im Verlauf des Tages

a. Mitochondrien

Insgesamt wurden für diese Untersuchungen 50 Tiere verwendet, die alle 4 Std in Gruppen zu je 3 Tieren getötet wurden. Das Ergebnis zeigt Figur 3.

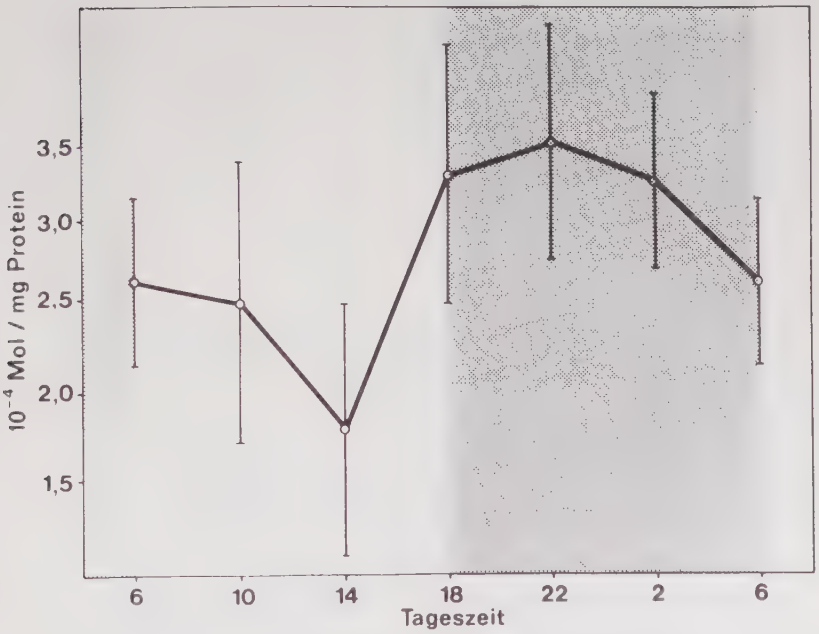

Fig. 3 ATP - Gehalt der Mitochondrien aus Rattenleber in vivo über 24 Std, bezogen auf Gesamtprotein. Die Dunkelperioden des L - D - Wechsels sind schattiert dargestellt. Die Kreise repräsentieren den Mittelwert von 7 - 11 Tieren und die senkrechten Strecken den dreifachen mittleren Fehler. Der 6.00 Uhr - Wert ist zweimal dargestellt.

Der ATP - Gehalt der Mitochondrien zeigt ausgeprägte rhythmische Veränderungen im Verlauf des Tages. Obwohl die Einzelwerte eine relativ große Variationsbreite aufweisen, unterscheiden sich Minimum und Maximum des ATP - Gehaltes signifikant voneinander. Das Minimum liegt um 14.00 Uhr mit einem Gehalt von $1,8 \times 10^{-4}$ Mol pro mg Gesamtprotein. Der mitochondriale ATP - Gehalt steigt zum Abend hin stark an und erreicht um 22.00 Uhr sein Maximum mit einem Wert von $3,6 \times 10^{-4}$ Mol / mg Protein. Die Ergebnisse der 18.00 und 2.00 Uhr - Untersuchungen zeigen ebenfalls einen sehr hohen Wert für den ATP - Gehalt von $3,2 \times 10^{-4}$ Mol / mg, sodaß man von einem breiten Maximum von 18.00 bis 2.00 Uhr sprechen kann. Auch die Werte um 18.00 und 2.00 Uhr sind statistisch gegenüber dem Minimum abgesichert. Am frühen Morgen sinkt der ATP - Gehalt konstant ab und erreicht in den Mittagsstunden das Minimum. Die Schwankungsbreite beträgt prozentual ausgedrückt 100%.

b. Zellkerne

Parallel zu den Messungen des mitochondrialen ATP - Gehaltes untersuchte ich den Gehalt in Rattenleberzellkernen.

Insgesamt verwendete ich hierfür 52 Tiere, die in Gruppen zu 3 Tieren alle 4 Std zu den angegebenen Zeiten getötet wurden.

Fig. 4 stellt den Verlauf des ATP - Gehaltes in Zellkernen über den Tag dar. Die ATP - Menge zeigt tagesperiodische Veränderungen. Ausgehend von einem Minimum am Morgen um 10.00 Uhr mit einem Gehalt von $3,55 \times 10^{-6}$ Mol / mg Protein steigt die ATP - Menge im Verlauf des Tages an und erreicht am Abend zu Beginn der Dunkelphase ihr Maximum mit $7,2 \times 10^{-6}$ Mol / mg Protein. In den ersten Stunden der Dunkelphase sinkt der ATP - Gehalt zwar ab, der 22.00 Uhr - Wert liegt jedoch statistisch noch im Bereich des 18.00 Uhr - Wertes. In der Mitte der Dunkelzeit ist ein starker Abfall im Gehalt zu verzeich-

nen, der 2.00 Uhr - Wert liegt statistisch bereits im Bereich des Minimums, das gleiche gilt für den 6.00 Uhr - Wert. Die prozentuale Zunahme der ATP - Menge in den Zellkernen beträgt zwischen Minimum und Maximum 103%. Im Vergleich mit dem Verlauf des ATP - Gehaltes über den Tag in den Mitochondrien ergibt sich eine um 4 Stunden frühere Phasenlage der Rhythmik.

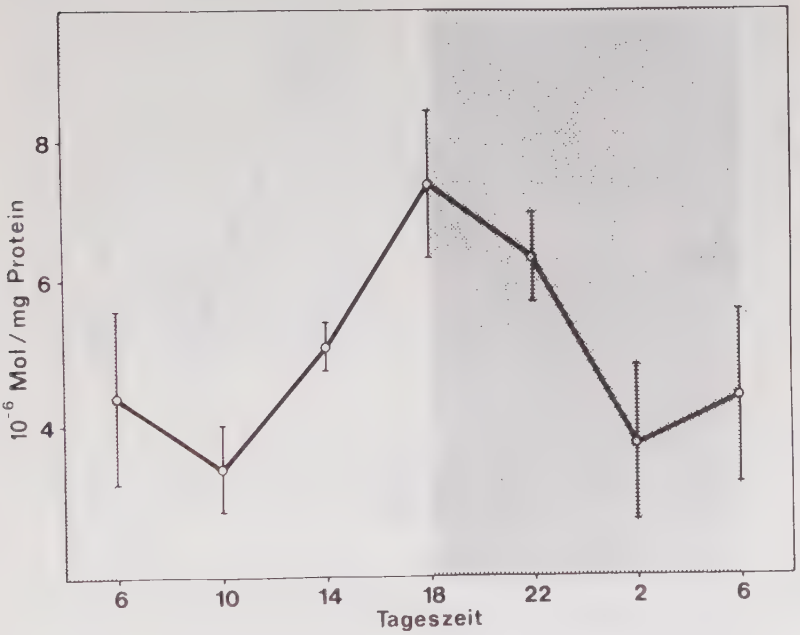

Fig. 4 ATP - Gehalt in Rattenleberzellkernen in vivo über 24 Std.
Jeder Kreis gibt den Mittelwert von 7 - 9 Tieren an.
Übrige Details wie in Fig. 3.

c. Cytoplasma

Da der Verbrauch von ATP hauptsächlich im Cytoplasma stattfindet,

erschien es wichtig, auch den Tagesverlauf des ATP - Gehaltes im Cytoplasma zu bestimmen. Pro Zeitpunkt verwendete ich hierfür 6 - 7 Tiere, die in Gruppen zu 3 Tieren getötet wurden. Das Ergebnis dieser Untersuchungen gibt Fig. 5 wieder.

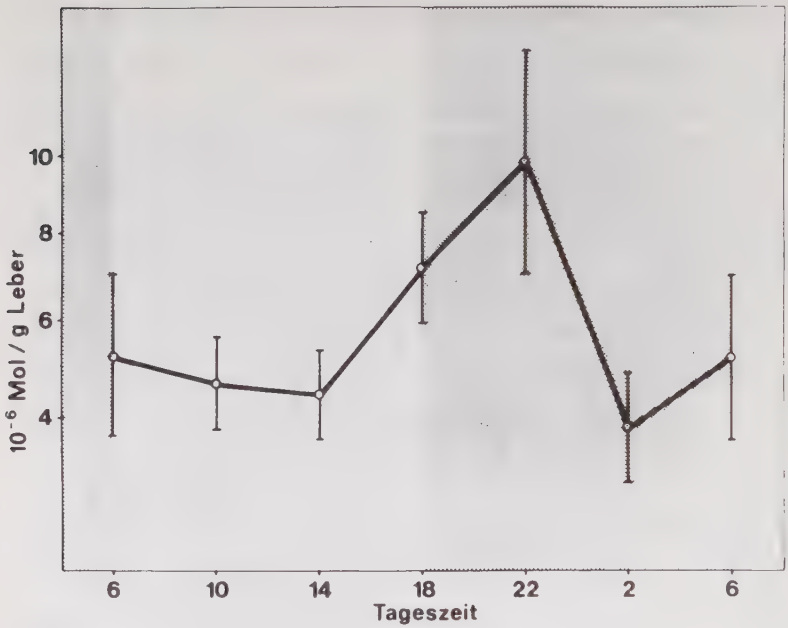

Fig. 5 Verlauf des ATP - Spiegels im Cytoplasma in vivo über 24 Std.
Jeder Kreis gibt den Mittelwert von 6 - 7 Tieren an.
Die Werte für den ATP - Gehalt sind bezogen auf Leberfrischgewicht in Gramm.
Übrige Einzelheiten wie in Fig. 3.

Als Bezugsgröße für den ATP - Gehalt benutzte ich das Frischgewicht der Leber. Es wäre in diesem Fall nicht sinnvoll, auf Protein zu beziehen, da ich nur lösliches Protein erfaßt hätte, das möglicherweise selber periodische Schwankungen über den Tag aufweist.

Die in Fig. 5 dargestellte Kurve weist ein breites Minimum auf, das von 2.00 Uhr morgens bis zum späten Mittag reicht. Der Gehalt an ATP beträgt in diesem Bereich ca. 5×10^{-6} Mol / g Leber, und der tiefste Punkt der Kurve wird um 2.00 Uhr mit $3,9 \times 10^{-6}$ / g erreicht. Gegen Abend steigt der ATP - Gehalt stark an, der höchste Gehalt wurde um 22.00 Uhr mit $9,8 \times 10^{-6}$ Mol / g Leber gemessen. Dies entspricht einer prozentualen Steigerung um 251%.

Der Verlauf des ATP - Gehaltes im Cytoplasma unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von den in Mitochondrien und Zellkernen gefundenen. Im Cytoplasma sind mit 251% mehr als doppelt so große prozentuale Schwankungen zwischen Minimum und Maximum zu verzeichnen. Der Bereich hohen ATP - Spiegels ist relativ schmal und beschränkt sich auf die ersten Stunden der Dunkelphase.

2. In vitro Untersuchungen zum ATP - Gehalt von Mitochondrien im Verlauf des Tages

Ausgangspunkt für diese Experimente war die Frage, ob Mitochondrien, herausgelöst aus dem zellulären System, weiterhin tagesrhythmische Veränderungen in ihrem ATP - Spiegel aufweisen. Ließe sich diese Frage positiv beantworten, wäre damit eine gute Möglichkeit gegeben, die tagesperiodische ATP - Regulation in den Mitochondrien in einem zellfreien System genauer zu analysieren. Für diese Fragestellung entwikkelte ich eine Methode zur Überführung und Haltung von Mitochondrien in Suspensionskultur. Dabei galt es zunächst einmal, die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien außerhalb des zellulären Systems zu überprüfen. Zu diesem Zweck führte ich mehrere Kontrollexperimente durch:

a. ATP - Synthese nach Zugabe von ADP zur Suspensionskultur

Nach einer Vorinkubationszeit von 11 Std wurden in Abständen von

3 - 5 Std Proben entnommen und der ATP - Gehalt der Mitochondrien bestimmt. Nach der Probenentnahme zur 35. Std gab ich 250 µMol ADP dem Kulturmedium zu und entnahm weitere Proben nach der 37. und 39. Std.

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt Fig. 6.

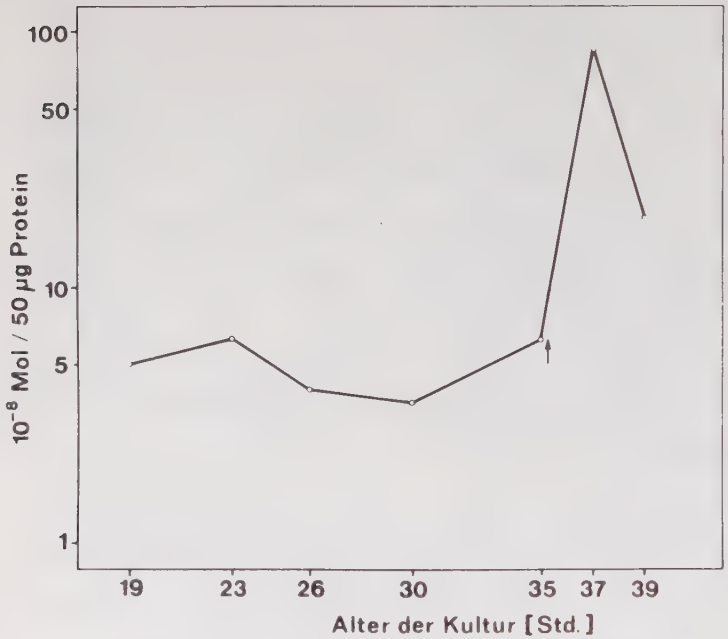

Fig. 6 Mitochondrialer ATP - Gehalt in Abhängigkeit von der Haltungsdauer in Suspensionskultur; ATP - Synthese nach Zugabe von 250 µMol ADP nach 35 Std (⬆).
Jeder Kreis gibt den Mittelwert von 2 Kulturen an.
Als Bezugsgröße für den ATP - Gehalt wurde Gesamtprotein gewählt.

Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei Experimenten. Die Werte für die Messungen nach 11 bzw. 15 Std wurden weggelassen. Es ergibt

sich ein steiler Abfall des ATP - Gehaltes in den Mitochondrien von ca. 10^{-5} Mol / 50 ug Protein zum Zeitpunkt der Überführung in Kultur auf 10^{-7} Mol / 50 ug Protein nach 12 Std Inkubationszeit. Danach verringert sich der ATP - Spiegel nur noch sehr langsam und beträgt nach 35 Std 6 x 10^{-8} Mol / 50 ug. Nach der Zugabe von ADP steigt der ATP - Gehalt um ca. 1400% auf 8,5 x 10^{-7} Mol / 50 ug Gesamtprotein innerhalb von 2 Std an. Vier Stunden nach Zugabe von ADP ergab sich ein Wert von 1,9 x 10^{-7} Mol / ug Protein: Er liegt damit immer noch um 315% über dem nach 35 Std gemessenen.
Dieser Versuch zeigt also, daß die Atmung in isolierten Mitochondrien durch Zugabe von ADP stimuliert werden kann.

b. Hemmung der ATP - Synthese nach Antimycin A - Behandlung
Ziel dieser Untersuchungen war es festzustellen, ob die strenge Kopplung zwischen Oxidation und Phosphorylierung in den isolierten Mitochondrien erhalten ist.
Drei Suspensionskulturen, die aus den Mitochondrien von jeweils 2 Rattenlebern hergestellt worden waren, wurden 20 Std vorinkubiert. Zu diesem Zeitpunkt gab ich 10^{-5} Mol Antimycin A zu den Kulturen hinzu, nachdem ich unmittelbar davor jeweils 20 ml - Proben zu Kontrollmessungen entnommen hatte. Diese Kontrollen und die zu den Zeitpunkten 0, 20, 40, 60 und 90 min nach Zugabe von Antimycin A entnommenen Proben wurden für 30 min mit 1 mMol ADP inkubiert und dann aufgearbeitet.
Fig. 7 stellt das Ergebnis dieser Experimente dar. Die Hemmung der ATP - Synthese nimmt mit steigender Antimycin A Behandlungsdauer zu und erreicht nach 70 min ein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt ist sie um ca. 60% gegenüber den Kontrollen verringert. Bei einer 90 - minütigen Behandlung nimmt die Antimycin A - Wirkung stark ab und ist nach 120 min mit 16% Hemmung fast aufgehoben.

Da Antimycin A in der Atmungskette die Reduktion von Cytochrom c blockiert, ist auf Grund der obigen Ergebnisse anzunehmen, daß in den isolierten Mitochondrien keine Entkopplung aufgetreten ist. Zur Kontrolle und zur Absicherung dieser Vermutung führte ich weitere Experimente mit Valinomycin durch.

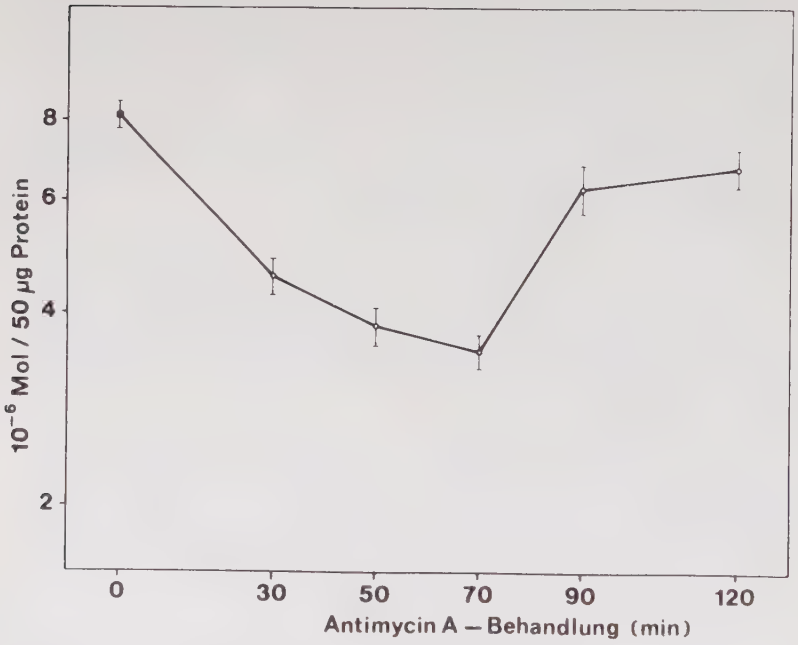

Fig. 7 In vitro Synthese von ATP in Mitochondrien nach Antimycin A - Gabe.
Antimycin A - Konzentration: 10^{-5} Mol.
Die Zeiten auf der Abzisse geben die Behandlungsdauer an. Dargestellt sind die Mittelwerte und dreifacher mittlerer Fehler; ■ Normalrate.

c. Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Valinomycin

Valinomycin erhöht spezifisch die Permeabilität der Mitochondrienmembran für Kalium; als Folge tritt bei intakten Mitochondrien eine

quantitative Hemmung der oxidativen Phosphorylierung auf, die vom Mechanismus her einer Entkopplung entspricht.

Diese Eigenschaft des Valinomycin benützte ich, um die in Kultur gehaltenen Mitochondrien auf ihre Funktionsfähigkeit und Unversehrtheit zu prüfen. Die Versuche wurden nach der gleichen Methode durchgeführt, die bei der Antimycin A - Behandlung angewendet wurde. Den Suspensionskulturen fügte ich 10^{-5} Mol Valinomycin hinzu und entnahm wie bei den Antimycin A - Versuchen in bestimmten Abständen Proben, die mit 1 mMol für 30 min inkubiert wurden. Das Ergebnis dieser Versuche gibt Fig. 8 wieder.

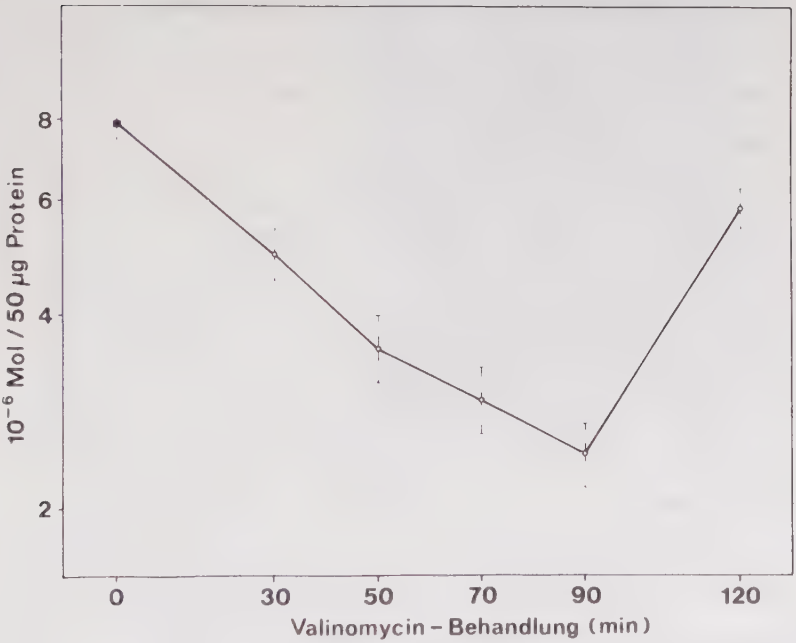

Fig. 8 Einfluß von Valinomycin auf die oxidative Phosphorylierung in vitro gehaltener Mitochondrien.
Valinomycin - Konzentration: 10^{-5} Mol.
Übrige Einzelheiten wie in Fig. 7.

Nach 90 min Behandlung erreicht die Syntheserate von ATP nur noch ca. 29% des Ausgangswertes, was einer 71%igen Hemmung entspricht. Bei längerer Behandlung steigt die Kurve wieder an, nach 120 min beträgt die Inhibition nur noch 30%.
Die Befunde dieser drei Versuchsreihen lassen den Schluß zu, daß zumindest ein Großteil der Mitochondrien die Isolierung und Haltung in Kultur ohne Schäden übersteht und die Kopplung zwischen der Oxidation und Phosphorylierung erhalten bleibt.

d. Verlauf des ATP - Gehaltes von in vitro gehaltenen Mitochondrien über 24 Std.

20 Std nach Überführung der Mitochondrien in Suspensionskultur begann ich mit den Untersuchungen. In Abständen von 4 Std wurden den Kulturen 30 ml Suspension entnommen und der ATP - Gehalt der Mitochondrien aus diesen Proben bestimmt.
Fig. 9 gibt das Ergebnis dieser Experimente wieder. Dargestellt ist der Mittelwert aus dem ATP - Gehalt von zwei Suspensionen. Der Gehalt sinkt zwischen der 20. und 40. Std der Inkubation um eine Zehnerpotenz von ca. 10^{-7} auf 10^{-8} Mol / 50 ug Protein ab. Im Verlauf des Tages erfolgt dieser Abfall relativ gleichmäßig, von einer Ausnahme abgesehen. Der 18.00 Uhr Wert erreicht mit $6{,}0 \times 10^{-8}$ Mol ATP / 50 ug Protein fast noch den 14.00 Uhr Wert mit $6{,}3 \times 10^{-8}$ Mol. Hier liegt der Gedanke nahe, wenn man einmal von den Veränderungen im absoluten Gehalt zwischen Anfang und Ende der Untersuchungen absieht, daß sich der ATP - Spiegel doch tagesperiodisch verändern könnte. Diese Vermutung wird unterstützt durch den in Fig. 6 nach 23 Std Kulturdauer gemessenen Wert, der seiner Tageszeit nach einer 19.00 Uhr Messung entspricht und der höher ist, als der 4 Std früher bzw. 3 Std später gemessene Wert. Es lassen sich jedoch z.Zt. keine eindeutigen

Aussagen zur Frage der Tagesperiodik des ATP - Gehaltes in vitro gehaltener Mitochondrien machen. Hier müßten weitere methodische Überlegungen angestellt werden (z.B. Herabsetzen der Haltungstemperatur von 37° auf 20° C, Variation des Kulturmediums, Modifikation der Methode zur Isolierung der Mitochondrien), um die Mitochondrien über noch längere Zeit in vitro halten zu können und damit in einen Bereich konstanten ATP - Spiegels zu gelangen.

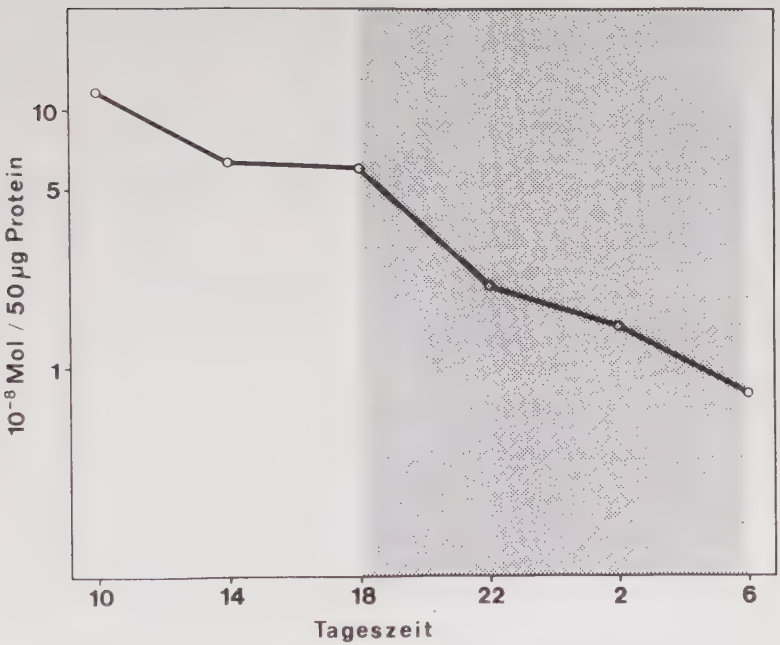

Fig. 9 ATP - Gehalt in vitro gehaltener Mitochondrien über 24 Std. Alter der Kulturen zu Beginn der Messungen: 20 Std.
Die Dunkelperiode des L-D-Wechsels ist schattiert dargestellt. Die Kreise geben den Mittelwert von 2 Kulturen an. Als Bezugsgröße für den ATP - Gehalt diente die Gesamtproteinmenge.

e. Kapazität der ATP - Synthese von Mitochondrien unter in vitro Bedingungen über 24 Std.

Im vier- bis sechsstündigen Abstand wurden aus den Mitochondriensuspensionen 50 ml abpipettiert, für 30 min mit 10 mM ADP inkubiert und anschließend ATP aus den Mitochondrien extrahiert. Bis zur Bestimmung der ATP - Konzentration bewahrte ich die Proben bei -18° C auf.

Die Werte dieser Experimente sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tageszeit		16^{00}	22^{00}	2^{00}	4^{00}	6^{00}	10^{00}	14^{00}	16^{00}	18^{00}
10^{-4} Mol ATP / 50 ug Protein	Kultur 1		3,5	3,2		3,2	3,1	3,0		2,9
	Kultur 2	3,8	3,9		3,7		3,7		3,6	
	Kultur 3	3,1	3,0		2,8		2,9		3,0	

Aus den Daten geht hervor, daß die ATP - Synthesekapazität der Mitochondrien keine signifikanten Änderungen im Tagesverlauf aufweist.

Da die ATP - Bestimmungen keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich einer rhythmischen Veränderung in isolierten Mitochondrien zuließen - möglicherweise auch deshalb, weil der ATP - Gehalt von Änderungen der ADP - Konzentration außerhalb der Mitochondrien abhängt - bestimmte ich die Aktivitäten einzelner wichtiger Enzyme in den Mitochondrien.

3. In vitro Untersuchungen zum Aktivitätsverlauf der Isocitrat - Dehydrogenase in Mitochondrien über 36 Std.

In Mitochondrien kommen zwei Formen der Isocitrat - Dehydrogenase (ICDH) vor, die unterschiedliche Coenzyme benötigen. Das NAD - spezifische Enzym (EC 1.1.1.41) ist ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert, während man das NADP - abhängige Enzym (EC 1.1.1.42)

sowohl in Mitochondrien als auch im Cytoplasma findet. Beide Typen benutzen die gleiche Seite des Nicotinamid - Ringes und katalysieren dieselbe Reaktion am Isocitrat. Sie unterscheiden sich jedoch in Molekülmasse und Regulation. Während das NADP - spezifische Enzym eine Molekülmasse von weniger als 90 000 besitzt und nur aus ein oder zwei Polypeptiden zusammengesetzt ist, hat das NAD - spezifische Enzym eine Molekülmasse von ca. 340 000 u und ist aus acht Untereinheiten mit einer Molekülmasse von 40 000 u zusammengesetzt. Im Gegensatz zum NADP-spezifischen Enzym, das nicht als allosterisches klassifiziert wird, aktiviert ADP das NAD - abhängige Enzym, es wird allgemein als wichtiger Regulator des Citrat - Zyklus angesehen.
Ich testete die Aktivität beider Enzyme an Suspensionskulturen isolierter Mitochondrien.

3.a. NAD - spezifische Isocitrat - Dehydrogenase

3.a.1. Hell - Dunkel - Wechsel 12 : 12 Std von 6.00 - 18.00 Uhr

Die Mitochondrien wurden so isoliert, daß sie gegen 14.00 Uhr in Kultur überführt werden konnten. Die Suspensionskulturen wurden dann für 20 Std vorinkubiert, die erste Messung erfolgte am nächsten Tag um 10.00 Uhr. Anschließend entnahm ich alle 6 Std über 36 Std hinweg eine Probe, die sofort aufgearbeitet wurde. Den Verlauf der NAD - spezifischen ICDH - Aktivität in 8 verschiedenen Suspensionen zeigt Fig. 10. Die Aktivitätsschwankung des Enzyms im Verlauf des Tages ist in den einzelnen Suspensionen unterschiedlich groß, allgemein ist ein Minimum der Aktivität am Ende der Hellphase und ein Maximum am Ende der Dunkelphase bzw. am Anfang der Hellphase zu finden. Einen besseren Überblick gestattet die statistische Auswertung aller Einzelergebnisse, wie sie in Fig. 11 dargestellt ist.

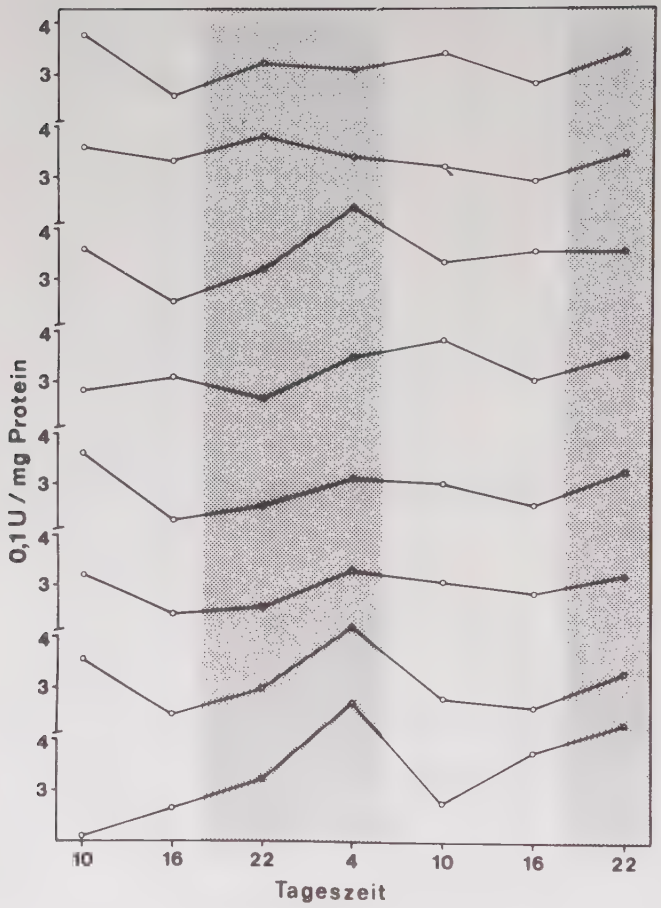

Fig. 10 NAD - spezifische ICDH: Aktivitätsverlauf in einzelnen Suspensionen über 36 Std. Die Dunkelperiode des L - D - Wechsels ist schattiert gezeichnet. Die Aktivität des Enzyms ist in U (internationale Enzymeinheiten) angegeben; Bezugsgröße - Gesamtprotein.

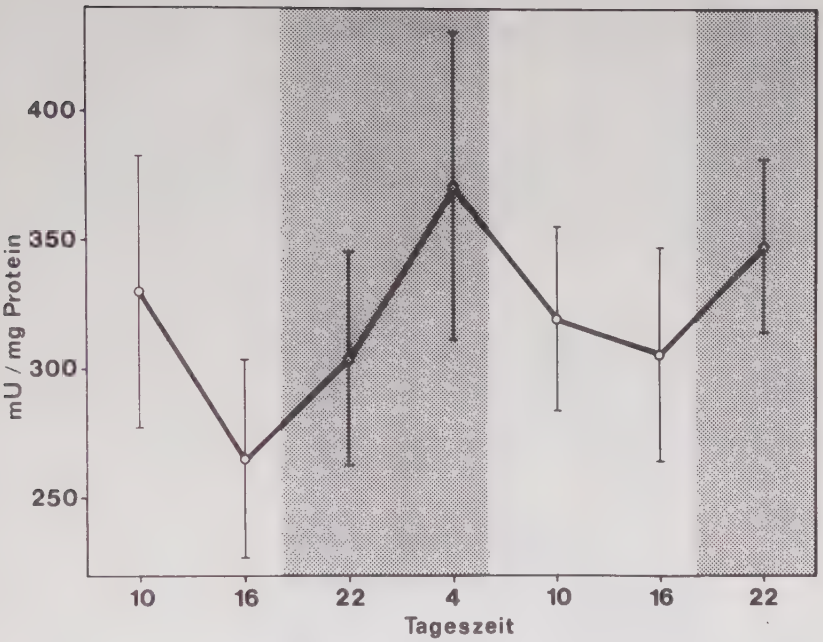

Fig. 11 NAD - spezifische ICDH: Enzymaktivität in vitro gehaltener Mitochondrien. Die Kreise stellen den Mittelwert aus 8 Suspensionen dar und die senkrechten Strecken den dreifachen mittleren Fehler.
Übrige Details wie in Fig. 10.

Hier zeigt sich ein signifikanter Tagesrhythmus der NAD - spezifischen ICDH - Aktivität. Von einem Minimum um 16.00 Uhr steigt die Aktivität steil an und erreicht gegen Ende der Dunkelphase um 4.00 Uhr das Maximum. Minimum und Maximum sind statistisch durch den dreifachen mittleren Fehler gegeneinander abgesichert. Die prozentuale Aktivitätsänderung zwischen Minimum und Maximum beträgt 40%. Zu Beginn der folgenden Hellphase fällt die Aktivität wieder ab, erreicht aber um 16.00 Uhr nicht mehr den minimalen Wert des Vortages. Anschlie-

ßend steigt die Kurve wieder an, der 22.00 Uhr Wert liegt signifikant höher als der erste um 16.00 Uhr gemessene.

3.a.2. Dauerdunkel

Wie unter 3.a.1. beschrieben, wurden die Suspensionen vorbereitet und die Messungen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Experimente (4 Suspensionen) ist in Fig. 12 dargestellt.

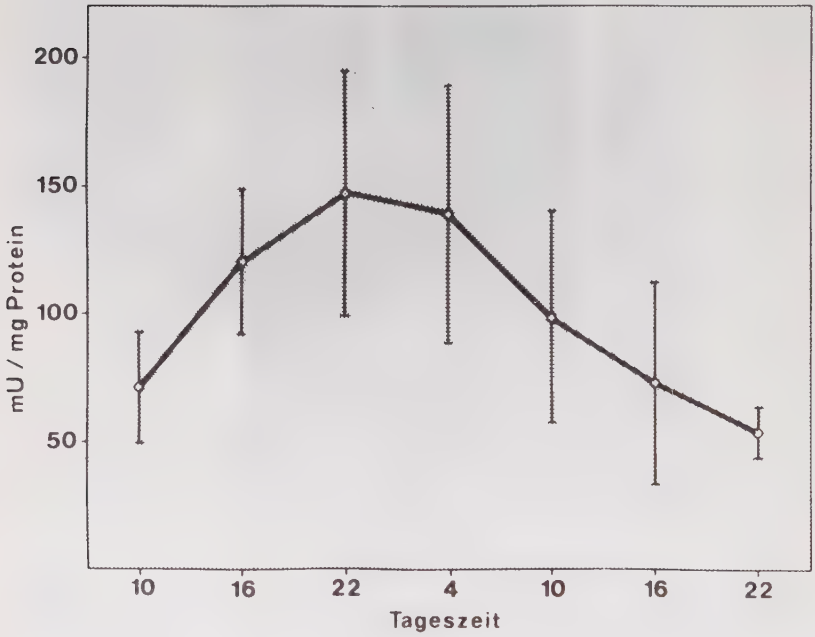

Fig. 12 NAD - spezifische ICDH: Enzymaktivität in vitro im Dauerdunkel gehaltener Mitochondrien. Die Kreise stellen den Mittelwert aus 4 Kulturen dar, die senkrechten Strekken den dreifachen mittleren Fehler. Übrige Einzelheiten wie in Fig. 10.

Der Verlauf der Enzymaktivität in Dauerdunkel unterscheidet sich

in wesentlichen Punkten von dem bei Licht - Dunkel - Wechsel. Die Aktivität steigt vom Beginn der Messungen um 10.00 Uhr bis zum Abend um 22.00 Uhr an, bleibt dann bis 4.00 Uhr ungefähr konstant, fällt anschließend gleichmäßig ab und erreicht um 22.00 Uhr des nächsten Abends den geringsten Wert. Wollte man hier noch von tagesrhythmischen Änderungen der ICDH - Aktivität sprechen, so müßte eine Periodenlänge von mindestens 36 Std angenommen werden. Wahrscheinlicher ist, daß es sich hier um ein Ausschwingen des in vivo und in vitro unter Licht - Dunkel - Wechsel beobachteten Tagesrhythmus handelt. Um den Einfluß von Licht auf die tagesrhythmischen Veränderungen der ICDH - Aktivität zu untersuchen, führte ich weitere Versuche in Dauerlicht durch.

3.a.3. Dauerlicht

Zwei Mitochondriensuspensionen hielt ich 24 Std bei Dauerlicht, bevor ich mit den Probenentnahmen begann. Um 16.00 Uhr beginnend, entnahm ich alle 6 Std über 24 Std Proben, aus denen die ICDH - Aktivität bestimmt wurde. Den Verlauf zeigt Fig. 13. Die rhythmischen Veränderungen in der Enzymaktivität, die bei Licht - Dunkel - Wechsel zu beobachten sind, treten bei Dauerlicht nicht auf. Die absolute Schwankungsbreite reicht von 129 mU / mg Protein um 22.00 Uhr bis zu 107 mU / mg um 4.00 Uhr, was einer Änderung von 20% entspricht, während bei Licht - Dunkel - Wechsel die Schwankungsbreite 40% beträgt. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen ist es also wahrscheinlich, daß die rhythmischen Veränderungen in der NAD - spezifischen ICDH - Aktivität durch den Licht - Dunkel - Wechsel bewirkt werden.

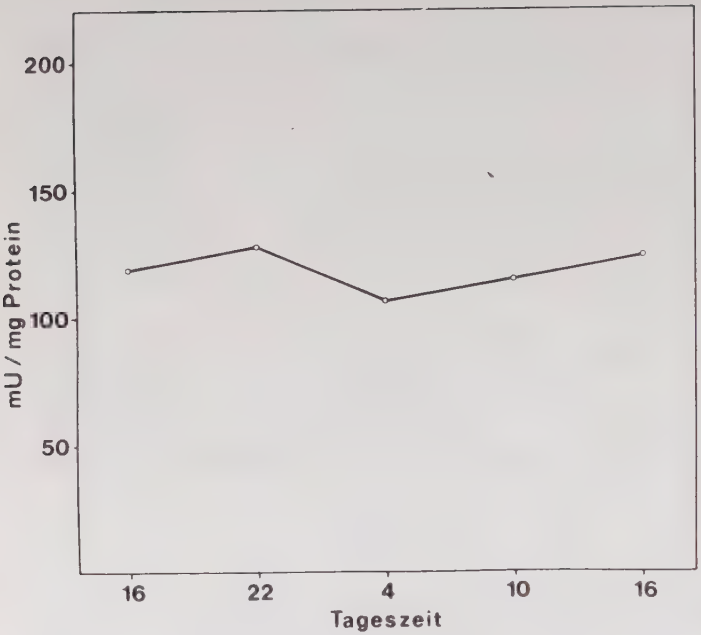

Fig. 13 NAD - spezifische ICDH: Enzymaktivität in Dauerlicht kultivierter Mitochondrien. Die Kreise geben den Mittelwert der Messungen in 2 Suspensionen an. Andere Einzelheiten siehe Fig. 10.

3.b. NADP - spezifische Isocitrat - Dehydrogenase

3.b.1. Hell - Dunkel - Wechsel 12 : 12 Std von 6.00 - 18.00 Uhr

Die Aktivität der NADP - abhängigen ICDH wurde in den gleichen Suspensionsproben bestimmt, die für die Messung der NAD - abhängigen ICDH benutzt wurden. Das Ergebnis für die NADP - spezifische ICDH ist in Fig. 14 dargestellt. Von einem hohen Aktivitätswert zu Beginn der Messungen um 10.00 Uhr fällt die Kurve anfangs sehr steil bis zum Beginn der Dunkelphase ab. Danach verlangsamt sich der Abfall,

der geringste Wert wird am folgenden Tag um 16.00 Uhr mit 263 mU / mg Protein gemessen. Zu Beginn der folgenden Dunkelphase steigt die Aktivität leicht an, doch liegen beide Werte (16.00 und 22.00 Uhr) weit im Bereich des dreifachen mittleren Fehlers. Die absolute Aktivitätsverringerung beträgt 351 mU / mg Protein, das entspricht einer prozentualen Änderung von 57%. Im Gegensatz zur NAD - spezifischen ICDH unter Licht - Dunkel - Wechsel lassen sich bei der NADP - abhängigen ICDH keine tagesrhythmischen Aktivitätsänderungen nachweisen.

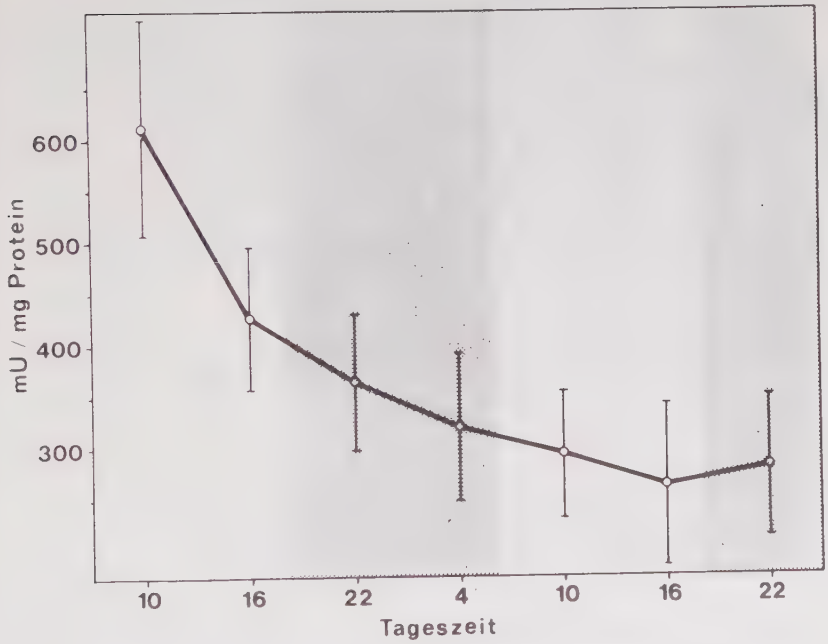

Fig. 14 NADP - spezifische ICDH: Enzymaktivität in vitro gehaltener Mitochondrien.
Übrige Details wie in Fig. 11.

3.b.2. Dauerdunkel

Der Aktivitätsverlauf der NADP - spezifischen ICDH unterscheidet sich bei Dauerdunkelhaltung der Mitochondrien ebenfalls von dem der NAD - abhängigen ICDH, wie aus Fig. 15 ersichtlich ist.

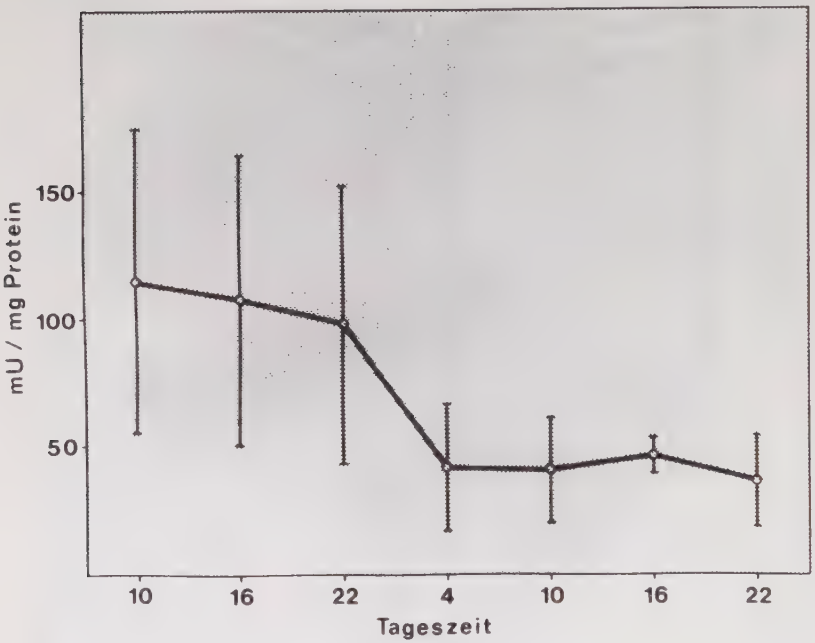

Fig. 15 NADP - spezifische ICDH: Enzymaktivität in Mitochondrien bei Dauerdunkelkultivierung. Alle übrigen Einzelheiten wie in Fig. 12.

Außer einem Absinken der Aktivität zwischen 22.00 und 4.00 Uhr lassen sich keine Veränderungen beobachten. Die Schwankungsbreite im Bereich von 10.00 bis 22.00 und von 4.00 Uhr bis zum Ende der Messungen ist sehr gering, die Werte liegen alle im Bereich des dreifachen mittleren Fehlers. Die durchschnittliche Aktivität liegt bei Haltung in Dauer-

dunkel auf einem erheblich niedrigeren Niveau als in Licht - Dunkel - Wechsel.

Dauerlichtversuche führten zu einem ähnlichen Ergebnis, wie es unter 3.a.3. beschrieben wurde. Auch hier zeigten sich keine wesentlichen Schwankungen der Enzymaktivität über den Verlauf des Tages.

C. DISKUSSION

Die Ergebnisse bezüglich des ATP - Gehaltes verschiedener Fraktionen aus Rattenleberzellen lassen erkennen, daß der ATP - Spiegel in Mitochondrien, Zellkernen und Cytoplasma tagesrhythmische Veränderungen aufweist. Zu dieser Fragestellung liegen bisher nur sehr wenige vergleichbare Arbeiten vor. So findet JONES (1970) in Leber und Gehirn von Goldhamstern Unterschiede im ATP - Gehalt zwischen Aktivitäts- und Ruhephase. Die von ihm gemessenen Werte sind während der Ruhephase höher als in der Aktivitätsphase, die mit der Dunkelperiode bei meinen Experimenten gleichzusetzen ist. VANDEN DRIESSCHE (1970) stellte Unterschiede im ATP - Gehalt der Chloroplasten von Acetabularia mediterranea zu Beginn der Hellzeit gegenüber der Mitte der Hellzeit fest. Die am Anfang der Lichtperiode gefundenen Werte lagen durchschnittlich um 50% höher. Diese Schwankungen im ATP - Gehalt blieben auch bei Dauerlicht bestehen. Ebenfalls an der Grünalge Acetabularia konnte KLITZING (1969) im Extrakt ganzer Pflanzen Schwankungen des ATP - Gehaltes in Abhängigkeit von der Zeit nachweisen. Sie wiesen weder konstante Frequenz noch Amplitude auf. Die gemessenen Periodenlängen lagen zwischen 4 und 9 min, wobei er sehr große Amplituden fand. Weder die Amplituden noch die Frequenzbereiche der Oszillationen konnten durch Kernentfernung wesentlich verändert werden. DELNER und BRODY (1975) fanden bei Neurospora crassa keine signifikanten Veränderungen im ATP - Gehalt, wohl aber deutliche tagesrhythmische Änderungen im AMP - Spiegel. Auch SWEENEY (1969) konnte im Zellextrakt von Gonyaulax polyedra keine Schwankungen über den Verlauf des Tages feststellen. In anderen Arbeiten wiederum wird über rhythmische Änderungen in der Enzymaktivität der Adenosin - 5´- triphosphatase (NISHIITSUSUJU - OWO et al., 1967) als auch der Adenylat - Kinase (FROSCH, WAGNER und CUMMING, 1973) be-

richtet. Wie aus der Reihe der aufgeführten Arbeiten zu ersehen, sind die bisherigen Ergebnisse widersprüchlich und teilweise unbefriedigend. Aber auch hinsichtlich des absoluten ATP - Gehaltes werden von den verschiedenen Autoren differierende Werte angegeben, was jedoch wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Methoden zur Extraktion und Bestimmung von ATP zurückzuführen ist.

Meine Befunde in Bezug auf den ATP - Gehalt der Mitochondrien - Kern- und Cytoplasma - Fraktion lassen den Schluß zu, daß in allen untersuchten Zellkompartimenten circadiane Schwankungen des ATP - Spiegels existieren. Zum einen sind alle Kurven durch den dreifachen mittleren Fehler statistisch abgesichert, zum anderen sind die Amplituden der Schwingungen so groß, daß ein Zustandekommen durch methodische Fehler ausgeschlossen werden kann. Vergleicht man meine Ergebnisse mit anderen Befunden zum Energiestoffwechsel der Rattenleber, so fügen sie sich gut in das Gesamtbild ein. Der Energiestoffwechsel der Leber ist während der Nacht höher als am Tage, nachgewiesen durch den Sauerstoffverbrauch in der Leber in vivo (PHILIPPENS, 1974) mit einem steilen Anstieg des O_2 - Verbrauches vor Beginn der Dunkelphase, einem schmalen Maximum am Anfang und einem relativ starken Absinken zum Ende der Dunkelperiode, bzw. an Leberschnitten (KIKUCHI und HOSOMI, 1967). Der von PHILIPPENS gefundene Verlauf des Sauerstoffverbrauchs in Rattenleber - Mitochondrien stimmt sehr gut überein mit dem von mir in Mitochondrien gemessenen ATP - Gehalt. Der Anstieg der ATP - Synthese zum Ende der Hellperiode ist wahrscheinlich auch korreliert mit den mannigfaltigen Syntheseleistungen der Leber, wie RNA- und Proteinsynthese bzw. Transportprozessen oder enzymatischen Reaktionen, die durch ATP stimuliert werden oder bei denen ATP als Cosubstrat dient. Ein Beispiel für die zuletzt erwähnten Reaktionen bietet die Regulation des Blutzuckerspiegels. Zur Aktivierung der Glykogen - Phosphorylase (Abbau von Glykogen) wird

ATP benötigt, gleichzeitig tritt Hemmung der Glykogen - Synthetase ein und als Folge eine Erhöhung der Blutglucose. Die Glykogen - Phosphorylase zeigt tagesrhythmische Veränderungen mit einem Maximum am Ende der Lichtperiode (VILCHEZ und DE VILCHEZ, 1971) bzw. einige Stunden später, wie SABLE´ und AGID (1970) berichten. Der diurnale Rhythmus der Blut - Glucose - Konzentration weist ein ausgeprägtes Maximum während der Dunkelphase um 22.00 Uhr auf (PAULY und SCHEVING, 1967). Beide Befunde stehen in Einklang mit dem von mir nachgewiesenen Verlauf des ATP - Spiegels in der Rattenleber.

In der Diskussion über die Ursachen des Tagesrhythmus des ATP - Gehaltes und der Phasenlage in den einzelnen Fraktionen - ob die ATP - Produktion ein schwingendes System an sich oder zusätzlich bzw. ausschließlich an andere Oszillatoren gekoppelt ist und wie in diesem Fall der Regulations- und Kopplungsmechanismus beschaffen ist - gibt es mehrere Hypothesen und Befunde. Vor dem Hintergrund der mannigfaltigen rhythmisch verlaufenden Prozesse scheint es sicher zu sein, daß in der Leber Perioden hohen Energieverbrauchs existieren und andere, bei denen der Energiebedarf relativ gering ist und damit auch die Energieproduktion. CHANCE und WILLIAMS (1956) als auch KLINGENBERG und SCHOLLMEYER (1960, 61) beschreiben einen Kopplungsmechanismus zwischen mitochondrialer Aktivität und Energieproduktion. Sie vermuten, daß bei Verkleinerung des ATP / (ADP x P_i) Quotienten sofort eine Stimulierung der oxidativen Phosphorylierung eintritt und somit jede Veränderung im Gehalt an energiereichem Phosphat in kurzer Zeit kompensiert wird. Diesem Modell widersprechen die zahlreichen Befunde, die bisher zur rhythmischen Organisation der Mitochondrien und des Energiestoffwechsels vorliegen. PHILIPPENS (1974) nimmt an, daß sich die Leberzellen während einer 24 - Std Periode auf längere Zeitspannen erhöhten Energieverbrauchs durch Vergrößerung der respiratorischen Kapazität der

Mitochondrien vorbereiten. Durch diesen Mechanismus ist die Leber in der Lage, auch den Anforderungen größerer Stoffwechselaktivität standzuhalten. Einer weitgehenden Entleerung des Energiepools bei stark erhöhter Stoffwechselaktivität wäre durch dieses System vorgebeugt. Seine Befunde in bezug auf den rhythmischen Verlauf einzelner Funktionen in Rattenlebermitochondrien (O_2 - Verbrauch, Succinat - NBT Reductase, Cytochrom C Reduktion) untermauern seine Annahme.
An dieser Stelle müssen auch Arbeiten angeführt werden, die sich mit dem Einfluß von Kationen auf Synthese und Transport von energiereichem Phosphat durch die Mitochondrienmembran sowie der Wirkung unterschiedlicher Metabolitenkonzentration von Citratzyklus und Atmungskette auf die oxidative Phosphorylierung beschäftigen. Viele Befunde an Säugetiermitochondrien deuten auf die Existenz eines Enzymkomplexes hin, der für den Transport von Adeninnucleotiden durch die Membran dieser Zellorganellen zuständig ist (BRIERLEY und O'BRIEN, 1965; PFAFF und KLINGENBERG, 1968; WINKLER et al., 1968). SPENCER und BYGRAVE (1971, 1972) finden eine Stimulierung der ATP - Translokation durch geringe Ca^{2+} - Gaben, während Calcium - Ionen den Transport von ADP durch die Membran sehr wenig beeinflussen können. Zum anderen sind aus Rattenleber isolierte Mitochondrien in der Lage, Ca^{2+} bevorzugt gegenüber Mg^{2+} zu akkumulieren (Zsf. LEHNINGER et al., 1967). Durch diesen Mechanismus sind Leberzellen prinzipiell dazu fähig, das (Mg^{2+}) / (Ca^{2+}) Verhältnis im Cytoplasma zu verändern und damit die Aktivität von Enzymen oder Stoffwechselwegen zu beeinflussen, die gegenüber diesem Verhältnis empfindlich sind. MELI und BYGRAVE (1972) berichten über Befunde zur Regulation der Pyruvat - Kinase - Aktivität, die durch Ca - Ionen reprimiert werden kann. Sie finden in einem in vitro System bei einem definierten Calcium - Magnesium - Verhältnis eine Stimulierung der Pyruvat - Kinase - Aktivität nach Zugabe von isolierten Rattenleber-

mitochondrien. Gleichzeitig messen sie die Aufnahme von radioaktiv markiertem Calcium in den Mitochondrien. Diese Befunde sind auch insofern für die Diskussion meiner Ergebnisse von Bedeutung, daß bei der Pyruvat - Kinase katalysierten Reaktion je Mol umgesetzten Phosphoenolpyruvats ein Mol ATP gebildet wird. MEISNER, PALMIERI und QUAGLARIELLO (1972) wiesen in isolierten Rattenlebermitochondrien eine verstärkte Aufnahme von Succinat, Malonat und Phosphat nach Zugabe verschiedener Kationen wie K^+ und Mg^{2+} nach. HÖFER und PRESSMAN (1966) berichten, daß ein Valinomycin - induzierter Kaliumtransport in die Mitochondrien aus Rattenleberzellen die Phosphorylierungsrate endogener Nucleotide erhöht. Unter gleichen Bedingungen finden sie auch eine gesteigerte Phosphorylierungsrate von zugefügtem ADP. Schließlich sind noch die Arbeit von SWEENEY (1974), die über circadiane Schwankungen des intracellulären K^+ - Gehaltes bei Gonyaulax polyedra berichtet und die Ergebnisse von BEHNEL und RENSING (1975) zu nennen, die einen Rückkopplungsmechanismus zwischen oxidativer Phosphorylierung und Genaktivität in Speicheldrüsen von Drosophila melagonaster nachweisen konnten.

Unter den oben genannten Aspekten ist es wenig wahrscheinlich, daß es sich bei dem ATP - Rhythmus um ein schwingendes System per se handelt. Es ist anzunehmen, daß der ATP - Stoffwechsel an verschiedene andere oszillatorische Prozesse in der Zelle gekoppelt ist. So wird verständlich, warum der ATP - Gehalt in allen untersuchten Fraktionen zu Beginn der Dunkelphase ein Maximum aufweist. Zu dieser Zeit weisen sehr viele Funktionen in den Rattenleberzellen eine Phase hoher Aktivität auf (Enzymaktivität, Proteinsynthese, Transkription).

Bei den Untersuchungen zum Verlauf des ATP - Gehaltes war es wichtig, auch in vitro Experimente durchzuführen. Für diese Fragestellung entwickelte ich eine Methode zur Suspendierung und längerdauernden Haltung

von isolierten Mitochondrien, die im folgenden diskutiert werden soll. WATTIAUX - DE CONINCK et al. (1973) und WATTIAUX (1974) berichten über den Einfluß von Temperatur und Zentrifugenbeschleunigung bei der Mitochondrienisolierung auf den Erhaltungszustand der Membranen und physiologischen Funktionen. Sie finden eine starke Zerstörung subzellulärer Strukturen in den Mitochondrien, wenn der hydrostatische Druck bei der Zentrifugation zu hoch wird, wobei sich dieser Effekt durch Temperaturerhöhung während der Zentrifugation teilweise kompensieren läßt. Veränderungen ergeben sich auch im Verteilungsmuster von vier Enzymen aus den unterschiedlichen mitochondrialen Kompartimenten. Da bei meiner Isolierungsmethode die Zentrifugalbeschleunigung nur etwa 1/20 des Wertes betrug, bei dem oben genannte Effekte auftreten, sind bei der Isolierung in dieser Beziehung keine drastischen Veränderungen der Mitochondrien zu erwarten. In bezug auf Lebensdauer und Funktionsfähigkeit von Mitochondrien in vitro liegen bisher kaum Befunde vor. ROMANI et al. (1974) inkubierten aus der Avokado - Frucht isolierte Mitochondrien über vier Tage bei 25^{o} C und fanden nur geringe Veränderungen der verschiedenen untersuchten Funktionen während dieses Zeitraums. Die Zugabe von Penicillin und Streptomycin zur Eindämmung des Bakterienwachstums in den Kulturen bewirkt nur eine sehr geringe Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese von ca. 9% (MADDAIAH, 1973). Bei meinen eigenen Kontrollexperimenten zur Frage des Erhaltungszustandes der Mitochondrien bei in vitro Bedingungen zeigt sich, daß die untersuchten Funktionen auch unter diesen Voraussetzungen erhalten bleiben: ATP - Synthese nach Zugabe von ADP zum Medium; Blockierung der ATP - Synthese nach Valinomycin- bzw. Antimycin A- Behandlung. Stimulierung der ATP - Synthese durch exogenes ADP tritt nur in Mitochondrien auf, bei denen Atmung und oxidative Phosphorylierung parallel ablaufen (VIGNAIS et al., 1975). Die Hemmung der ATP - Synthese nach Inkubation mit Valinomycin und Anti-

mycin A deutet auf eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung hin (MC MURRAY und BEGG, 1959; HÖFER und PRESSMAN, 1966). Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß in bezug auf den Energiestoffwechsel die Mitochondrien keinen Schaden nehmen und die Kopplung zwischen Atmung und Phosphorylierung erhalten bleibt. Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse über rhythmische Veränderungen des ATP - Gehaltes von isolierten Mitochondrien in vitro zu diskutieren. Aufgrund der Tatsache, daß der ATP - Spiegel während der Messungen ständig absinkt, lassen sich aus den Ergebnissen keine eindeutigen Aussagen über Existenz oder Fehlen eines circadianen Rhythmus in den isolierten Mitochondrien machen. Auch in der Kapazität der ATP - Synthese nach Zugabe von ADP ergeben sich keine eindeutigen tagesrhythmischen Veränderungen. Die Ursache dafür, daß sich zur Zeit keine definitiven Aussagen machen lassen, ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zu suchen. Vielmehr spielen hier wahrscheinlich methodische Probleme eine Rolle, die bereits in Abschnitt 2d bei der Beschreibung der Ergebnisse erwähnt wurden und bei weiterführenden Untersuchungen gelöst werden müssen. Wie bereits oben bei der Diskussion der in vivo Befunde angesprochen, spielen Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien und Cytoplasma für den zeitlichen Verlauf des ATP - Spiegels eine große Rolle. Es ist deshalb denkbar, daß das Fehlen der Rückkopplungsmechanismen unter in vitro Bedingungen zu einem Ausfall der in vivo beobachteten tagesrhythmischen Veränderungen im ATP - Gehalt führt. Um dennoch möglicherweise Aufschlüsse über die rhythmische Organisation isolierter Mitochondrien zu erhalten, untersuchte ich den Aktivitätsverlauf von zwei Enzymen des Citrat - Zyklus, wobei zumindest ein Enzym eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiestoffwechsels spielt.

Ich bestimmte die Aktivität der Isocitrat - Dehydrogenase, von der zwei von unterschiedlichen Coenzymen abhängige Formen in Rattenleber - Mito-

chondrien vorkommen, ein NAD - spezifisches Enzym, welches ausschließlich in Mitochondrien und ein NADP - abhängiges Enzym, das sowohl in Mitochondrien und Cytoplasma vorkommt (PLAUT, 1963). Beide Enzyme katalysieren die Decarboxylierung der Isocitronensäure zur α - Ketoglutarsäure (ROSE, 1966) und benutzen den Nicotinamid - Ring in gleicher Weise (CHEN und PLAUT, 1963). Unterschiedlich sind jedoch Molekülmasse und Aggregation aus Untereinheiten (CARLIER und PANTALONI, 1973; GIORGIO et al., 1970) sowie Regulation und Bedeutung für den Endabbau (PLAUT, 1970). Wie schon unter Punkt 3 der Ergebnisse kurz erwähnt, übt ADP eine aktivierende Wirkung auf das NAD - spezifische Enzym aus. Hierbei sind bisher folgende Effekte bekannt: Verkleinerung der Michaelis - Konstante für Substrat und 2-wertige Metall - Ionen als Aktivatoren, Verschiebung des Aktivitätsoptimums zu höheren pH - Werten, Aggregation der Enzymuntereinheiten und Stabilisierung der Enzymaktivität. Einen aktivierenden Einfluß auf die Enzymaktivität übt auch NAD^+ aus, während NADH und ATP reprimierende Wirkung besitzen. Das NAD - spezifische Enzym ist in den Mitochondrien deshalb von größerer Bedeutung, da es den Wasserstoff an die Atmungskette weitergibt, während das NADP - abhängige Enzym im Cytoplasma den Wasserstoff für Synthesen verfügbar macht. Über seine Regulation ist bisher nur sehr wenig bekannt. Meine Befunde zum Aktivitätsverlauf dieser beiden Enzyme und hier speziell des NAD - abhängigen Enzyms müssen in diesem Zusammenhang diskutiert werden. Bei den verschiedenen Versuchsbedingungen im Experiment zeigt nur die NAD - spezifische Isocitrat - Dehydrogenase bei Licht - Dunkel - Wechsel einen ausgeprägten Tagesrhythmus. Geht man von der Annahme aus, daß bei diesem Enzym kein schwingendes System an sich vorliegt, so müssen ein oder mehrere Faktoren für das Auftreten des Enzymrhythmus verantwortlich sein. Da die Menge an verfügbarem Substrat unter den gegebenen Versuchsbedingungen relativ konstant bleibt, ist es wahrscheinlich,

daß die oben genannten Nucleotide einen regulatorischen Einfluß auf die Enzymaktivität ausüben. Dieser regulatorische Effekt der Nucleotide wurde von mehreren Arbeitsgruppen für das NAD - abhängige Enzym nachgewiesen (CHEN und PLAUT, 1963; HATHAWAY und ATKINSON, 1963; SANWALL et al., 1964; STEIN et al., 1967). Das würde bedeuten, daß die NAD - ICDH durch ein großes ATP : ADP Verhältnis in den Mitochondrien bzw. eine hohe "energy charge" (ATKINSON, 1968 a) reprimiert und durch eine niedrige "energy charge" induziert wird. ATKINSON (1968 b) beschreibt die große Bedeutung der energy charge für die Kontrolle der NAD - ICDH und einiger anderer Enzyme für Mitochondrien aus Pflanzengeweben. Befunde an isolierten Rattenlebermitochondrien scheinen darauf hinzuweisen, daß die Adeninnucleotide nicht allein für die Regulation der Isocitrat - Oxidation verantwortlich sind (WILLIAMSON und OLSON, 1968; WOJCZAK, 1968). PLAUT und AOGAICHI (1968) finden in Lebermitochondrien ebenfalls eine Kontrolle durch das NADH : NAD^+ Verhältnis und vermuten, daß auch die freie Verfügbarkeit von Mg^{2+} - Ionen regulatorische Funktion für die Enzymaktivität besitzt. Zusammenfassend läßt sich aus den bisher vorliegenden Ergebnissen schließen, daß der Tagesrhythmus der NAD - abhängigen Isocitrat - Dehydrogenase - Aktivität unter den gegebenen in vitro Bedingungen durch rhythmische Konzentrationsänderungen der oben genannten Nucleotide und / oder 2-wertiger Metallionen bewirkt wird. Die Frage, welches dieser Systeme am Zustandekommen des Enzymrhythmus beteiligt ist, läßt sich im Moment nicht klären. Wenn Veränderungen im Nucleotidgehalt der Mitochondrien den Enzymrhythmus induzieren, sollten Schwankungen im Energiepool der Mitochondrien nachgewiesen werden können. Für den ATP - Spiegel lassen sich jedoch aus meinen eigenen Untersuchungen keine eindeutigen Hinweise auf einen Tagesrhythmus entnehmen. Als weitere mögliche Ursachen für das Zu-

standekommen des Enzymrhythmus sind Permeabilitätsänderungen der Mitochondrienmembran zu nennen. Wie schon oben bei der Diskussion der in vivo Ergebnisse erwähnt, sind isolierte Mitochondrien in der Lage, Ca^{2+} - Ionen bevorzugt gegenüber Mg^{2+} - Ionen durch die Membran aufzunehmen. Möglicherweise wird also der Tagesrhythmus der Enzymaktivität durch rhythmische Veränderungen der Membranpermeabilität hervorgerufen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Untersuchungen an Gonyaulax polyedra, bei denen ein circadianer Rhythmus der intracellulären K^{+} - Ionen - Konzentration nachgewiesen werden konnte (SWEENEY, 1974). Als Ursache für die Schwankungen im K^{+} - Gehalt kommen nur rhythmische Permeabilitätsänderungen der Membran in Betracht. Neben Permeabilitätsänderungen der Membran kommen noch konformationelle Änderungen in Frage, die ihrerseits zu unterschiedlichen festen Enzym - Membranbindungen führen könnten, wie sie von ASHKENAZI et al. (1975) für das Zustandekommen einer Tagesrhythmik in isolierten Erythrozyten diskutiert werden. Die Tatsache, daß ein signifikanter Tagesrhythmus der NAD - spezifischen ICDH nur bei Licht - Dunkel - Wechsel zu beobachten ist, macht deutlich, daß auch die direkte Wirkung von Licht auf Mitochondrien berücksichtigt werden muß. Zu dieser Fragestellung liegen bisher eine Reihe von Ergebnissen vor, die sowohl an pflanzlichem als auch tierischem Material gewonnen wurden (Zsf. RENSING, 1973). Licht verschiedener Wellenlänge beeinflußt einzelne Prozesse in Mitochondrien: Blaulicht hemmt die Atmung in Mitochondrien durch Zerstörung von Cytochromen der Atmungskette (NINNEMANN et al., 1970 a, b), hellrotes Licht stimuliert die Phosphorylierung, sodaß sich dadurch möglicherweise Auswirkungen auf den ATP - Gehalt der Mitochondrien ergeben könnten, wie sie von JONES (1972) an pflanzlichem und tierischem Material nachgewiesen wurden. Überträgt man diese Befunde auf die hier dis-

kutierten Probleme, so ist es wahrscheinlich, daß in isolierten Mitochondrien lichtinduzierte Schwankungen in der ATP - Konzentration existieren, die dann ihrerseits den Rhythmus der ICDH - Aktivität synchronisieren könnten. Für die Existenz der oben aufgezeigten Wechselwirkungen spricht auch die Tatsache, daß die NADP - spezifische ICDH in den von mir untersuchten Kulturen keine rhythmischen Schwankungen aufweist, wobei methodische Fehler so gut wie ausgeschlossen sind, da beide Enzyme aus den gleichen Mitochondrienextrakten bestimmt wurden.

Zum Schluß soll auf die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für die Diskussion von Modellen eingegangen werden, die den molekularen Mechanismus des primären Oszillators zu erklären versuchen und hier speziell auf das Modell von WAGNER. Es basiert auf der Hypothese, daß die circadiane rhythmische Kontrolle in der Zelle durch einen rhythmischen Energiestoffwechsel gesteuert wird. Nach dieser Vorstellung wird der Energiestoffwechsel durch einen Rückkopplungsmechanismus zwischen Glykolyse im Cytoplasma und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien reguliert. Der von mir unter in vitro Bedingungen beobachtete Tagesrhythmus der ICDH - Aktivität in den Mitochondrien würde den Modellvorstellungen von WAGNER widersprechen, wenn es sich bei diesem Tagesrhythmus um eine endogene Schwingung handelt, da die Möglichkeit eines "feed back" in isolierten, aus dem zellulären System herausgelösten Mitochondrien nicht gegeben ist. Ein lichtinduzierter exogener Rhythmus wäre auf der anderen Seite mit diesem Modell verträglich und würde sogar einen Hinweis auf die Synchronisierbarkeit durch Licht liefern. Andererseits können auch Änderungen der Mitochondrienmembran für den Tagesrhythmus verantwortlich sein (s.o.), womit das Membranmodell von NJUS et al. (1974) unterstützt würde.

Es kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht entschieden werden,

ob der Tagesrhythmus des Energiestoffwechsels primär ist, oder zusammen mit anderen rhythmischen Funktionen den primären Oszillator bildet bzw. nur von anderen Oszillatoren gesteuert wird. Hierzu sind weitere Untersuchungen unter Optimierung des in vitro Systems nötig.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Bestimmung des ATP - Gehaltes verschiedener Zellfraktionen in vivo ergeben sich ausgeprägte tagesrhythmische Veränderungen. In Mitochondrien und Cytoplasma wird der maximale Gehalt um 22.00 Uhr gemessen, während in den Zellkernen das Maximum bereits um 18.00 Uhr erreicht wird. In Cytoplasma und Zellkernen sinkt der ATP - Gehalt schon um 2.00 Uhr am Morgen auf den minimalen Wert ab, in den Mitochondrien dagegen beschränkt sich der Bereich niedrigen ATP - Spiegels auf die Mittagsstunden.
2. Die Atmung isolierter Mitochondrien kann unter in vitro Bedingungen durch Hinzufügen von ADP zum Kulturmedium stimuliert werden, der ATP - Gehalt steigt 2 Std nach Zugabe von 250 µMol um das 14 - fache an.
3. Antimycin A bewirkt eine Hemmung der ATP - Synthese in Mitochondrien aus Suspensionskulturen um 60% gegenüber den Kontrollen, Valinomycin unter gleichen Bedingungen um 71%. Beide Antibiotika wirken als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Bei einem Großteil der Mitochondrien in Suspensionskultur bleibt demnach die Kopplung erhalten.
4. In Suspensionskulturen lassen sich keine signifikanten tagesperiodischen Änderungen des mitochondrialen ATP - Spiegels nachweisen. Auch die Synthesekapazität für ATP schwankt nicht tagesrhythmisch.
5. Die Aktivität der NAD - spezifischen Isocitrat - Dehydrogenase weist in Suspensionskulturen isolierter Mitochondrien unter Hell - Dunkel - Wechsel signifikante tagesrhythmische Veränderungen auf. Ausgehend von einem Minimum um 16.00 Uhr steigt die Aktivität steil an und erreicht gegen Ende der Dunkelphase um 4.00 Uhr das Maximum.

Die prozentualen Schwankungen zwischen Minimum und Maximum betragen 40%. Unter Dauerdunkelbedingungen treten ebenfalls Aktivitätsänderungen auf, sie ergeben jedoch kein tagesrhythmisches Muster. Es handelt sich hier wahrscheinlich um ein Ausschwingen des unter Licht - Dunkel - Wechsel beobachteten Rhythmus. Werden die Mitochondriensuspensionen bei Dauerlicht gehalten, lassen sich nur sehr geringe Schwankungen der Enzymaktivität nachweisen.

6. Bei der Untersuchung des Aktivitätsverlaufs der NADP - spezifischen Isocitrat - Dehydrogenase in Mitochondrien aus Suspensionskulturen werden sowohl unter Licht - Dunkel - Wechsel als auch bei Dauerlicht und Dauerdunkel keine signifikanten tagesperiodischen Änderungen beobachtet.

E. LITERATUR

ALEDORT, L.M., R.I. WEED and S.B. TROUP (1966):
Ionic effects on firefly bioluminescence assay of red blood cell ATP.
Anal. Biochem. 17, 268 - 277

ANDREWS, R.V. and G.E. FOLK Jr. (1964):
Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands.
Comp. Biochem. Physiol. 11, 393 - 409

ASCHOFF, J. (1965):
Circadian clocks.
Amsterdam; North Holland Publishing Company, 1965

ASHKENAZI, J.E., H.H. HARTMANN, B. STRULOWITZ and O. DAR (1975):
Activity rhythms of enzymes in human red blood cell suspensions.
J. Interdiscipl. Cycle Res. 6, 291 - 301

ATKINSON, D.E. (1968 a):
The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feed - back modifiers.
Biochemistry 7, 4030 - 4034

ATKINSON, D.E. (1969 b):
Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism.
in: The metabolic roles of citrate.
(T.W. GOODWIN, ed.)
Biochem. Soc. Symp. No. 27, 23 - 39
Academic Press, New York, 1968

BEHNEL, J. und L. RENSING (1975):
Respiratory functions involved in the induction of puffs in Drosophila salivary glands.
Exptl. Cell Res. 91, 119 - 124

BERNT, E. und H.U. BERGMEYER (1974):
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, 3. Aufl. 1974, 660 - 663

BLOBEL, G. and V.R. POTTER (1966):
Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield.
Science, 154, 1662 - 1665

BRIERLEY, G.P. and R.L. O'BRIEN (1965):
Compartmentation of heart mitochondria.
II. Mitochondrial adenine nucleotides and the action of atractyloside.
J. Biol. Chem. 240, 4532 - 4539

BÜNNING, E. (1964):
The physiological clock.
Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg 1964

CARLIER, M.F. and D. PANTALONI (1973):
NADP - linked isocitrate dehydrogenases from beef liver. Purification, quaternary structure and catalytic activity.
Eur. J. Biochem. 37, 341 - 354

CHANCE, B. and G.R. WILLIAMS (1956):
The respiratory chain and oxidative phosphorylation.
Advan. Enzymol. 17, 65 - 134

CHEN, R.F. and G.W.E. PLAUT (1963):
Studies on the hydrogen transfer mediated by the DPN - linked isocitric dehydrogenase of heart.
Biochemistry 2, 752 - 756

COLMAN, R.F. (1975):
Mechanisms for the oxidative decarboxylation of isocitrate: Implications for control.
in: Advances in Enzyme Regulation, 13
(G. Weber, ed.)
Pergamon Press, Oxford 1975, 413 - 433

CUMMING, B.G. and E. WAGNER (1968):
Rhythmic processes in plants.
Ann. Rev. Plant Physiol., 381 - 416

DELMER, D.P. and S. BRODY (1975):
Circadian rhythms in Neurospora crassa: Oscillation in the level of an adenine nucleotide.
Journal of Bacteriology 121, 548 - 553

DENBURG, J.L. and W.D. MC ELROY (1970):
Anion inhibition of firefly luciferase.
Arch. Biochem. Biophys. 141, 668 - 675

DRIESSCHE, VANDEN T. (1970):
Circadian variation in ATP content in the chloroplasts of Acetabularia mediterranea.
Biochim. Biophys. Acta 205, 526 - 528

EHRET, C.F. and R. MATHER (1959):
Circadian rhythmicity in the incorporation of nucleic acid precursors into Paramecium bursaria.
J. Protozool. 6, Suppl. 1, 8

EHRET, C. and E. TRUCCO (1967):
Molecular models for the circadian clock.
I. The chronon concept.
J. Theor. Biol. 15, 240 - 262

FROSCH, S. und E. WAGNER (1973):
Endogenous rhythmicity and energy transduction.
II. Phytochrome action and the conditioning of rhythmicity of adenylate kinase, NAD - and NADP - linked glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase in Chenopodium rubrum by temperature and light intensity cycles during germination.
Canad. J. Bot. 51, 1521 - 1528

FROSCH, S.; E. WAGNER und B.G. CUMMING (1973):
Endogenous rhythmicity and energy tranduction.
I. Rhythmicity in adenylate kinase, NAD and NADP - linked glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase in Chenopodium rubrum.
Canad. J. Bot. 51, 1355 - 1367

GIORGIO, N.A., A.J. YIP, J. FLEMING and G.W.E. PLAUT (1970):
DPN - linked isocitrate dehydrogenases from bovine heart, polymeric forms and subunits.
J. Biol. Chem. 245, 5469 - 5477

HARDELAND, R. (1972):
Circadian rhythmicity of tyrosine aminotransferase activity in suspensions of isolated rat liver cells.
J. interdiscipl. Cycle Res. 3, 109 - 114

HARDELAND, R., D. HOHMANN und L. RENSING (1973):
The rhythmic organization of rodent liver.
A review.
J. interdiscipl. Cycle Res. 4, 89 - 118

HASTINGS, J.W. and B.M. SWEENEY (1958):
A persistent diurnal rhythm of luminescence in Gonyaulax polyedra.
Biol. Bull. 115, 440 - 458

HATHAWAY, J.A. and D.E. ATKINSON (1963):
The effect of adenylic acid on yeast nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase, a possible metabolic control mechanism.
J. Biol. Chem. 238, 2875 - 2881

HÖFER, M. and B.C. PRESSMAN (1966):
Stimulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by potassium in the presence of valinomycin.
Biochemistry 5, 3919 - 3925

JONES, P.C.T. (1970):
Studies on the nature of circadian rhythms.
1. Nucleoside phosphate levels in the tissues of wakeful and sleeping Golden Hamsters; and their significance.
Cytobios 7 - 8, 175 - 179

JONES, P.C.T. (1972):
Central role for ATP in determining some aspects of animal and plant cell behaviour.
J. theor. Biol. 34, 1 - 13

KALBHEN, D.A. und H.J. KOCH (1967):
Methodische Untersuchungen zur quantitativen Mikrobestimmung von ATP in biologischem Material in dem Firefly - Enzym - System.
Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem. 5, 299 - 304

KIKUCHI, M. und A. HOSOMI (1967):
Einfluß des Licht - Dunkel - Wechsels auf den O_2 - Umsatz der Rattenleber.
Experienta 23, 23 - 24

KLINGENBERG, M. und P. SCHOLLMEYER (1960 / 61):
Zur Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung.
Adenosintriphosphat - abhängige Atmungskontrolle und Reduktion von Diphosphopyridinnucleotid in Mitochondrien.
Biochem. Z. 333, 335 - 350

Der Einfluß von Adenosintriphosphat auf die Atmungskette in atmenden Mitochondrien.
Biochem. Z. 335, 231 - 242

Der Einfluß von Adenosintriphosphat auf die Atmungskette in atmungsgehemmten Mitochondrien.
Biochem. Z. 335, 243 - 262

KLITZING, L. von (1969):
Oszillatorische Regulationserscheinungen in der einzelligen Grünalge Acetabularia.
Protoplasma 68, 341 - 350

LEE, R.T., J.L. DENBURG and W.D. MC ELROY (1970):
Substrate - binding properities of firefly luciferase. II. ATP - binding site.
Arch. Biochem. Biophys. 141, 38 - 52

LEHNINGER, A.L., E. CARAFOLI and C. ROSSI (1967):
Energy - linked ion movements in mitochondrial systems.
Advan. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 29, 259 - 320

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951):
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

MADDAIAH, V.T., R.K. SHARMA, V. BALACHANDAR, I. REZVANI, P.J. COLLIPP and S. CHEN (1973):
Effect of growth hormone on mitochondrial protein synthesis.
J. Biol. Chem. 248, 4263 - 4268

MEISNER, H., F. PALMIERI and E. QUAGLIARIELLO (1972):
Effect of cations and protons on the kinetics of substrate uptake in rat liver mitochondria.
Biochemistry 11, 949 - 955

MC MURRAY, W.C. and R.W. BEGG (1959):
Effect of valinomycin on oxidative phosphorylation.
Arch. Biochem. Biophys. 84, 546 - 548

MELI, J. and F.L. BYGRAVE (1972):
The role of mitochondria in modifying calcium - sensitive modification of pyruvate kinase activity.
Biochem. J. 128, 415 - 420

MILLS, J.N. (1966):
Human circadian rhythms.
Physiol. Rev. 46, 128 - 171

NIINEMANN, H., W.L. BUTLER and B.L. EPEL (1970 a):
Inhibition of respiration in yeast by light.
Biochim. Biophys. Acta 205, 499 - 506

NIINEMANN, H., W.L. BUTLER and B.L. EPEL (1970 b):
Inhibition of respiration and destruction of cytochrome A_3 by light in mitochondria and cytochrome oxidase from beef heart.
Biochim. Biophys. Acta 205, 507 - 512

NISHIITSUTSUJU - OWO, J., R.N. TOWNSEND, H. NAKAJIMA and C.S. PITTENDRIGH (1967):
Day - night variation in the enzymatic dephosphorylation of ATP in hamster liver fractions.
Comp, Biochem. Physiol. 22, 319 - 323

NOUS, D., F.M. SULZMANN and J.W. HASTINGS (1974):
Membrane modell for the circadian clock.
Nature 248, 116 - 120

PAULY, J.E. and L.E. SCHEVING (1967):
Circadian rhythms in blood glucose and the effect of different lighting schedules, hypophysectomy, adrenal medullectomy and starvation.
Am. J. Anat. 120, 627 - 636

PFAFF, E. und M. KLINGENBERG (1968):
Adenine nucleotide translocation in mitochondria.
1. Specifity and control.
Eur. J. Biochem. 6, 66 - 79

PHILIPPENS, K.M.H. (1974):
Circadian variations in rat liver mitochondrial activity.
in: Chronobiology.
(Scheving, L.E., F. Halberg und J.E. Pauly, eds.)
Igaku Shoin Ltd., Tokyo 1974, 23 - 28

PLAUT, G.W.E. (1963):
Isocitrate dehydrogenases.
in: The Enzymes, 2nd edition
(Boyer, P.D., H. Hardy und K. Myrback, eds.)
Academic Press, New York 1963, 105 - 126

PLAUT, G.W.E. (1970):
DPN - linked isocitrate dehydrogenases of animal tissues.
Current Topics in Cellular Regulation 2, 1 - 27

PLAUT, G.W.E. and T. Aogaichi (1968):
Purification and prosperities of diphosphopyridine nucleotide - linked isocitrate dehydrogenase of mammalian liver.
J. Biol. Chem. 243, 5572 - 5583

POTTER, V.R. and C.A. ELVEHJEM (1936):
A modified method for the study of tissue oxidations.
J. Biol. Chem. 114, 495 - 504

RENSING, L. (1967):
Neuere Ergebnisse zur Cytologie, Biochemie und Zellphysiologie circadianer Rhythmen.
Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. 103 - 105

RENSING, L. (1973):
Biologische Rhythmen und Regulation.
G. Fischer Verlag, Stuttgart 1973, 193 - 197

ROMANI, R.J., S.E. TUSKES and S. ÖZELKÖK (1974):
Survival of plant mitochondria in vitro.
Form and function after 4 days at 25° C.
Arch. Biochem. Biophys. 164, 743 - 751

ROSE, Z.B. (1966):
The stereochemistry of the NAD - specific isocitric dehydrogenase reaction.
J. Biol. Chem. 241, 2311 - 2313

SABLÉ, R. and R. AGID (1970):
Rythmes d'activité de la glycogène phosphorylase et de la glycogène synthétase due foie de souris.
C. R. Soc. Biol. 164, 444 - 447

SCHNEIDER, W.C. and G.H. HOGEBOOM (1950):
Intracellular distribution of enzymes.
V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates.
J. Biol. Chem. 183, 123 - 128

SPENCER, T. and F.L. BYGRAVE (1971):
Stimulation by calcium ions of atractyloside - sensitive adenine nucleotide translocation in rat liver mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1290 - 1295

SPENCER, T. and F.L. BYGRAVE (1972):
Modification by calcium ions of adenine nucleotide translocation in rat liver mitochondria.
Biochem. J. 129, 355 - 365

STREHLER, B.L. and W.D. MC ELROY (1957):
Assay of Adenosine Triphosphate.
Methods in Enzymology 3, 871 - 873
Academic Press, New York, London

STREHLER, B.L. and J.R. TOTTER (1952):
Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms.
I. Substrate and enzyme determination.
Arch. Biochem. Biophysics 40, 28 - 41

STRUMWASSER, F. (1965):
The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neuron.
in: Circadian clocks.
(J. Aschoff, ed.)
Amsterdam; North Holland 1965, 442 - 462

SUCHY, J. and C. COOPER (1974):
Isolation and respiatory measurements on a single large mitochondrion.
Experimental Cell Research 88, 198 - 202

SWEENEY, B.M. (1969):
Transduccing mechanism between circadian clock and overt rhythms in Gonyaulax.
Canadian J. Bot. 47, 299 - 308

SWEENEY, B.M. (1974):
The potassium content of Gonyaulax polyedra and phase changes in the circadian rhythm of stimulated bioluminescence by short exposures to ethanol and valinomycin.
Plant Physiol. 53, 337 - 342

SWEENEY, B.M. and F.T. HAXO (1961):
Persistence of a photosynthetic rhythm in enucleated Acetabularia.
Science 134, 1361 - 1363

VIGNAIS, P.V., P.M. VIGNAIS and J. DOUSSIERE (1975):
Functional relationship between the ADP / ATP - carrier and the F_1 - ATPase in mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 376, 219 - 230

VILCHEZ, C.A. and I.E. SAFFE DE VILCHEZ (1971):
Circadian rhythm in mouse liver phosphorylase activity.
J. interdiscipl. Cycle Res. 2, 55 - 62

WATTIAUX, R. (1974):
Behaviour of rat - liver mitochondria during centrifugation in a sucrose gradient.
Mol. & Cell. Biochem. 4, 21 - 29

WATTIAUX - DE CONINCK, S. M. RONVEAUX - DUPAL, F. DUBOIS and R. WATTIAUX (1973):
Effect of temperature on the behaviour of rat - liver mitochondria during centrifugation in a sucrose gradient.
Eur. J. Biochem. 39, 93 - 99

WILLIAMSON, J.R. and M.S. OLSON (1968):
Control of citrate and acetoacetate synthesis in rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 794 - 799

WINKLER, H.H., F.L. BYGRAVE and A.L. LEHNINGER (1968):
Characterization of the atractyloside - sensitive adenine nucleotide transport system in rat liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 243, 20 - 28

WOJTCZAK, A.B. (1968):
Control of acetoacetate and ß - hydroxybutyrate production in rat liver mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 634 - 640

Lebenslauf

Am 19. Juni 1945 wurde ich, Dietmar Laspe, in Göttingen als Sohn des Postbeamten Walter Laspe und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Harte, geboren.
Ab April 1951 besuchte ich die Herbartschule in Göttingen. Nach der vierjährigen Grundschulzeit ging ich Ostern 1955 auf das Felix - Klein - Gymnasium, Göttingen. Im Februar 1964 bestand ich dort das Abitur. Zum SS 1964 nahm ich das Studium der Chemie auf. Im WS 1966 / 67 begann ich mit dem Studium des Faches Biologie als Hauptfach und setzte die Chemieausbildung im Nebenfach fort. Im April 1968 legte ich die Vorprüfung im Fach Biologie ab. Von 1970 bis 1972 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft bei der Anthropologischen Forschungsstelle des Zoologischen Institutes der Universität Göttingen tätig. Während dieser Zeit fertigte ich eine Diplomarbeit im Fach Zoologie mit dem Thema: "Eigenschaften und Tagesrhythmik einiger Enzyme der Mäuseleber", an und bestand im Oktober 1972 das Diplom in Biologie mit den Fächern Zoologie, Chemie und Anthropologie. Im Anschluß daran begann ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. L. Rensing mit den Experimenten zu einer Promotionsarbeit mit dem Arbeitsthema: "Regulation der Lactat - Dehydrogenase in der Rattenleber". Diese Versuche mußte ich nach einem Jahr abbrechen, da zu diesem Zeitpunkt wesentliche Ergebnisse in bezug auf meine Fragestellung veröffentlicht wurden. Im Herbst 1973 begann ich mit den Experimenten zu der vorliegenden Arbeit.
Neben der Promotion war ich für ein Jahr Akademischer Tutor am Lehrstuhl für Anthropologie der Universität Göttingen.
Von April 1974 bis November 1975 unterrichtete ich als Lehrer i.A. an der Handelslehranstalt Northeim. Am 1. Dezember 1975 wurde ich als Referendar dem Studienseminar Hannover I zugewiesen und zum 1. Februar 1976 an das Studienseminar Göttingen versetzt und führe hier die Ausbildung am Felix - Klein - Gymnasium fort.